

Kartierung von Epstein-Barr Virus Proteinen auf dem Genom
und Untersuchungen zu deren Expression

Rudolf Seibl

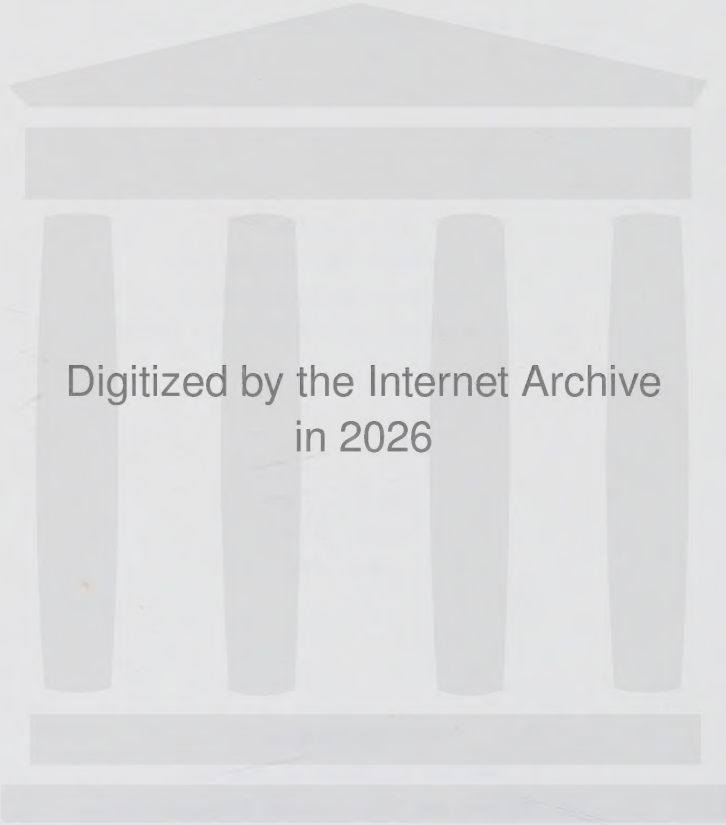
Diss
München
1985

Kartierung von Epstein-Barr Virus Proteinen auf dem Genom
und Untersuchungen zu deren Expression

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rudolf Seibl
Juli 1985

durchgeführt am
Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung Molekulare Virologie, Prof.Dr.Hans Wolf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0045

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Dezember 1985

Inhalt

Verzeichnis der Abkürzungen	6
Zusammenfassung	8
A. Einleitung	10
1. Die Familie der Herpesviren	10
2. Die Biologie des Epstein-Barr Virus	12
3. Die DNA des Epstein-Barr Virus	18
4. Die Expression des Epstein-Barr Virus	21
5. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	27
B. Material und Methoden	31
1. Biologisches Material	31
2. Isolierung von Nukleinsäuren	32
2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	32
2.1.1. SDS-Methode	32
2.1.2. Alkali-Methode	33
2.1.3. Alkali-Methode zur Schnellanalyse	33
2.2. Isolierung von DNA aus Charon4A-Phagen	34
2.3. Isolierung von DNA aus M13-Phagen	35
2.4. Isolierung von RNA und DNA aus Eukaryontenzellen	36
2.5. Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren	37
3. Elektrophorese von Nukleinsäuren	37
3.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	38
4. Blotting von Nukleinsäuren und Hybridisierung	39
4.1. Blotting von DNA	39
4.2. Blotting von RNA	39
4.3. Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation	40
4.4. Hybridisierung von Southern Blots	40
4.5. Hybridisierung von Northern Blots	41
5. Hybrid Selection	41
6. In vitro Translation	42
6.1. Herstellung eines Kaninchen-Retikulozytenlysats	42

6.2.	In vitro Translation	44
7.	Klonieren von DNA-Fragmenten	45
7.1.	Material	45
7.2.	Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmente	47
7.3.	Herstellung kompetenter Bakterien	48
7.4.	Ligierung und Transformation	48
7.5.	Screening der erhaltenen Rekombinanten	49
8.	Expression von eukaryontischen Proteinen in Bakterien	50
8.1.	Expressionsvektoren	50
8.2.	Klonierung von EBV-Sequenzen in Expressionsvektoren	51
8.3.	Produktion und Reinigung der exprimierten Proteine	52
8.4.	Immunisierung der Kaninchen	53
9.	Zellkultur	53
9.1.	In vivo Markierung von Proteinen	53
9.2.	Superinfektion	54
10.	Immunfluoreszenz	55
11.	Immunpräzipitation	56
12.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
13.	Blotting von Proteinen	57
C.	Ergebnisse	59
1.	Restriktionskartierung der EBV-DNA	59
2.	In vitro Translation von EBV-Proteinen	60
3.	Kartierung von EBV-Proteinen durch hybrid selected Translation	64
3.1.	Proteine aus induzierten P3HR1-Zellen	64
3.2.	Proteine aus induzierten Raji-Zellen	69
3.3.	Feinkartierung durch M13-Klone mit kleinen Inserts	74
3.4.	Kartierung von immediate early Proteinen	83
3.5.	Hybridisierung mit RNA aus unbehandelten Raji- und BJA-Zellen - Translation kreuzhybridisierender zellulärer Transkripte	88
4.	Zuordnung in vivo markierter Proteine zu den kartierten Translationsprodukten	91
5.	Charakterisierung der BamH1 Z Region	96
5.1.	Zur Wahl dieser Region	96

5.2.	Subklonierung der Region	99
5.2.1.	Klonierung einzelsträngiger und doppelsträngiger Hybridisierungsproben	99
5.2.2.	Klonierungen zur Expression der Leserahmen in Bakterien	100
5.3.	Kartierung durch hybrid selected Translation	104
5.4.	Kartierung durch Northern Blots	111
5.5.	Expression der Proteine in Bakterien und ihre Reinigung	111
5.6.	Identifizierung der Proteine in den Zellen	117
5.6.1.	Immunpräzipitation	117
5.6.2.	Immunfluoreszenz	122
D.	Diskussion	124
1.	Allgemeines	124
2.	Translation eines kreuzhybridisierenden zellulären Transkripts	126
3.	Kartierung von immediate early Proteinen	127
4.	Kartierung von Proteinen auf dem Genom	130
5.	Expressionsmodell der BamH1 Z Region	133
6.	Übersicht der Expression des Epstein-Barr Virus	139
	Literatur	161
	Eigene Veröffentlichungen	185
	Danksagung	188
	Lebenslauf	189

Verzeichnis der Abkürzungen

atm	Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaar
ccm	Kubikcentimeter
Ci	Curie
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
d	Dalton
DATD	Diallyltartardiamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EA	frühes (early) Antigen
EBNA	EBV assoziiertes nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis- (β -Aminoethylether)N,N'-Tetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GC-Gehalt	Guanosin plus Cytosin Gehalt
gp	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HSV	Herpes Simplex Virus
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
lac	Laktose
LYDMA	lymphocyte detected membrane antigen (von Lymphozyten erkanntes Membran-Antigen)
M	Molar

MA	Membran-Antigen
Min.	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger (Boten) Ribonukleinsäure
N	Normal
NPC	Nasopharynx-Karzinom
O.D.	Optische Dichte
PAA	Phosphonoessigsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RI	Refraktionsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulphat
Sek.	Sekunde
SSC	NaCl/Na-Citrat-Puffer
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TPA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (Phorbolester)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
T _S	Schmelzpunkt
VCA	Virus-Kapsid-Antigen
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus, ein Herpesvirus des Menschen, ist der Erreger der Infektiösen Mononukleose und mit zwei Tumorerkrankungen des Menschen - dem Burkitt Lymphom und dem Nasopharynx-Karzinom - assoziiert. Nach der Primärfektion verbleibt das Virus lebenslang im Körper, wird häufig in geringen Raten mit dem Speichel ausgeschieden und ist latent in B-Lymphozyten nachzuweisen, denen es die Fähigkeit zu potentiell unbegrenztem Wachstum verleiht.

Die Expression des Epstein-Barr Virus ist auf mehreren Ebenen reguliert. Zur weiteren Aufklärung dieser Regulation ist es notwendig, einzelne relevante Gene gezielt zu untersuchen. Als Voraussetzung dafür wurden in dieser Arbeit die Epstein-Barr Virus-Proteine auf dem Genom kartiert. Ein weiterer Grund für die Kartierung war, die Expression medizinisch relevanter Proteine durch gentechnologische Methoden in heterologen Systemen zu ermöglichen. Dies verspricht die Diagnostik der EBV-assoziierten Erkrankungen erheblich zu verbessern.

Durch hybrid selected Translation mit einer großen Anzahl von DNA-Klonen konnten die Proteine einem eng definierten DNA-Bereich zugeordnet werden. Für viele davon konnten mit Hilfe der vollständigen Nukleotidsequenz der EBV-DNA (Baer et al 1984) die Leserahmen, in denen sie kartieren, ermittelt werden. Desweiteren wurden Informationen zur Transkription dieser Gene erhalten. Durch die Verwendung von RNA aus unterschiedlichen Zelllinien und den Einsatz von Hemmstoffen konnten die kartierten Proteine in immediate early, frühe und späte eingeteilt werden, und Unterschiede in der Expression einzelner Proteine in den verschiedenen Zelllinien dokumentiert und kartiert werden. Durch vergleichende Immunpräzipitation mit einzelnen Patientenseren und monospezifischen Kaninchenseren konnten einer Reihe der kartierten in vitro translatierten Proteine die entsprechenden in vivo produzierten EBV-Proteine zugeordnet werden. Einige dieser monospezifischen Seren wurden selbst hergestellt, indem einzelne Leserahmen in Bakterien exprimiert, die Expressionsprodukte gereinigt und Kaninchen damit

immunisiert wurden. Mit Hilfe dieser Seren konnten die in den Leserahmen kodierenden Proteine immunpräzipitiert werden. Zwei posttranslational modifizierte Proteine, die nach in vivo Markierung ein anderes Molekulargewicht aufweisen als nach in vitro Translation, und ein Membranprotein wurden auf diese Weise identifiziert. Die Transkription der für diese Proteine kodierenden DNA-Region wurde durch Northern Blots und hybrid selected Translation mit subklonierten DNA-Fragmenten untersucht.

Bei der Kartierung der Proteine wurden in EBV-negativen Zellen mit einem EBV-DNA Fragment kreuzhybridisierende zelluläre Transkripte identifiziert, die in vitro translatierbar sind.

A. Einleitung

1. Die Familie der Herpesviren

Mehr als 80 verschiedene Mitglieder der Familie der Herpesviren sind bisher entdeckt worden, wobei der Wirtsbereich von Pilzen, Austern, Fischen, Amphibien, Reptilien bis zu den Säugetieren reicht (Honess und Watson 1977). Herpesviren verursachen in ihren natürlichen Wirten normalerweise keine schwerwiegenden Erkrankungen, sie persistieren jedoch nach einer Primärinfektion über lange Zeiträume hinweg im Körper - oft ohne Symptome einer Erkrankung - und können noch nach Jahrzehnten trotz vorhandener Antikörper wieder aktiviert werden. In Neugeborenen und bei Patienten mit Immundefizienz kann es jedoch zu gravierenden Erkrankungen kommen.

Die Viren enthalten eine einzelne, lineare, doppelsträngige DNA von 120 000 bis 240 000 Basenpaaren, mit einem GC-Gehalt von 32% - 75% (Honess 1984). Das ikosaedrische Kapsid mißt 100 - 200 nm im Durchmesser, enthält 162 Kapsomere und ist von einer Envelope (Hülle) aus Lipiden und Proteinen, die meist glykosiliert sind, umgeben. Bei der Infektion einer Zelle binden Viruspartikel an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, der Envelope fusioniert mit der Zellmembran und das Kapsid gelangt in das Cytoplasma. Das Uncoating (Freisetzen der Nukleinsäure) beginnt im Cytoplasma und ein Protein-DNA-Komplex wird rasch in den Zellkern transportiert. Typisch für die Herpesviren ist eine kaskadenartige Regulation der Proteinsynthese, wobei zuerst nur einige wenige Gene transkribiert werden, die sogenannten immediate early (unmittelbar ersten), alpha oder primären Gene, für deren Transkription und Translation die vorherige Synthese von Virusproteinen nicht nötig ist. Eine Strukturkomponente des infizierenden Viruspartikels verstärkt zumindest im Falle des Herpes Simplex Virus Typ 1 die Expression der immediate early Gene (Batterson und Roizman 1983), indem sie in trans auf spezifische regulatorische Sequenzen vor den Genen wirkt (Preston et al 1984, Kristie und Roizman 1984). Diese

immediate early Proteine schalten die Produktion der frühen, beta oder sekundären Proteine an. Unter diesen befinden sich mehrere viruskodierte Enzyme des Nukleinsäurestoffwechsels (DNA-abhängige DNA-Polymerase, Thymidin-Kinase, alkalische Deoxyribonuklease, Ribonukleotid-Reduktase), die die Replikation der Virus-DNA im Zellkern ermöglichen. Die Synthese der immediate early Proteine wird in der frühen Phase abgeschaltet. Nach der Replikation der DNA werden die späten, gamma oder tertiären Proteine synthetisiert, zu denen vor allem die Strukturproteine gehören. Nach dem Virusassembly (Viruszusammenbau) im Zellkern budden (knospen) die Kapside meist durch die innere Kernmembran und erhalten so ihre Lipidhülle. Die fertigen Partikel werden dann durch das endoplasmatische Retikulum nach außen transportiert.

Aufgrund ihres biologischen Verhaltens können die Herpesviren in drei große Gruppen unterteilt werden (Roizman et al 1981), die im folgenden kurz dargestellt werden:

- Alphaherpesviren infizieren meist Epithelzellen der Haut, der Augen, des Rachenraums und der Geschlechtsorgane und verursachen vesikuläre Läsionen. Sie können sich in einem weiten Bereich von Zell- und Gewebearten vermehren. Nach der Primärinfektion persistieren sie meist in Nervenzellen und können periodische Rekurrenzen verursachen. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die humanpathogenen Herpes Simplex Virus Typ 1 und Typ 2 und das Varicella Zoster Virus, der Erreger der Windpocken (Primärinfektion) und der Gürtelrose (Rezidiv). In der Zellkultur haben Alphaherpesviren einen relativ breiten Wirtsbereich und kurze Generationszeiten.

- Betaherpesviren bewirken oft eine Vergrößerung der infizierten Zellen, darum werden sie auch Cytomegalieviren genannt. Sie haben in vivo und in vitro einen engen Wirtsbereich und weisen in der Zellkultur lange Generationszeiten auf. Der normale Verlauf einer Infektion sowie der Ort der Persistenz sind noch nicht völlig geklärt. Infektionen mit dem humanen Cytomegalievirus äußern sich im immunkompetenten Wirt in der Regel nicht in einem spezifischen Krankheitsbild - es können verschiedene Organe betroffen sein.

- Gammaherpesviren vermehren sich und persistieren in Lymphozyten. Man

kann sie weiter unterteilen in B-Zell-spezifische und T-Zell-spezifische: T-Zell-spezifische Herpesviren wurden bisher nur in Neuweltaffen und niederen Wirbeltieren gefunden. Sie können aus den T-Lymphozyten der persistierend inapparent infizierten natürlichen Wirtsspezies isoliert werden. In nahen Verwandten der natürlichen Wirte können einige Vertreter dieser Gruppe (z.B. Herpesvirus Saimiri) polyklonale maligne lymphoproliferative Erkrankungen hervorrufen. In vitro können diese Viren in einer Reihe von nicht-lymphoiden Zelllinien vermehrt werden. Die B-Zell-spezifischen Herpesviren sind untereinander nahe verwandt und wurden bisher nur in Altweltaffen und Primaten gefunden. Nur auf B-Lymphozyten wurden bisher Rezeptoren für diese Viren nachgewiesen. Nach der meist inapparent oder milde verlaufenden Primärinfektion sind lebenslanglich B-Lymphozyten nachweisbar, die Virus-DNA latent enthalten. Zu dieser Gruppe gehört das Epstein-Barr Virus, das fünfte bekannte Herpesvirus des Menschen.

2. Die Biologie des Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist ein ubiquitär verbreitetes Virus, mit dem nahezu alle Erwachsenen infiziert sind. Der Zeitpunkt der Primärinfektion ist abhängig vom sozioökonomischen Milieu und variiert vom frühen Kindesalter bis ins junge Erwachsenenalter. In der Dritten Welt sind bereits die Kinder mit vier Jahren nahezu vollständig durchseucht, während als anderes Extrem 1968 nur etwa die Hälfte aller neu aufgenommenen Studenten in Yale EBV-positiv waren (Henle und Henle 1979).

Das Krankheitsbild der Erstinfektion ist die infektiöse Mononukleose, wobei möglicherweise die Schwere der Erkrankung mit steigendem Alter zunimmt und eine Infektion im Kleinkindalter häufig asymptomatisch verläuft. Verbreitete Symptome sind vergrößerte Lymphknoten, Fieber, Entzündungen des Rachenraums und Milzvergrößerungen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Proliferation der B-Lymphozyten, die von einer Proliferation der T-Lymphozyten zu deren Unterdrückung gefolgt wird.

Nach einer älteren Modellvorstellung vermehrt sich das Epstein-Barr Virus in B-Lymphozyten, die nach einer lytischen Infektion absterben oder von der Immunabwehr eliminiert werden. Ein kleiner Teil der B-Lymphozyten wird dagegen durch das Virus latent infiziert und potentiell immortalisiert. Gelegentlich kommt es zu einer Reaktivierung dieser latent infizierten Zellen, und an bestimmten Stellen des Körpers (vor allem im Oropharynx) kommt es daraufhin zu kurzzeitiger Virussynthese. Nach neueren Vorstellungen vermehrt sich das Virus ständig in niederen Raten in der Ohrspeicheldrüse (Wolf et al 1984) und möglicherweise auch an anderen Stellen des Oropharynx (Sixbey et al 1984). Produzierende Zellen und Viren werden durch die ausführenden Gänge der Parotis ausgeschieden. Durch freigesetztes Virus werden permanent neue Lymphozyten infiziert. Das Virus verbleibt im immunologisch kompetenten Organismus weitgehend latent und immortalisiert die Zellen. Die Virusausscheidung im Speichel ist erheblich verbreiteter als früher angenommen wurde. Mindestens 60% der gesunden seropositiven Erwachsenen ohne Anzeichen einer akuten EBV-Infektion (bei einer Überprüfung des Speichels über längere Zeiträume hinweg sogar mehr als 90%) scheiden Epstein-Barr Virus mit dem Speichel aus (Yao et al 1985a). Wie nach dem Modell der ständigen Neutransformation von B-Lymphozyten auch zu erwarten, ist bei jedem Menschen die Zahl der im Körper zirkulierenden, latent infizierten B-Lymphozyten eng korreliert mit der Menge an Virus, das mit dem Speichel ausgeschieden wird (Yao et al 1985a, 1985b). Es stellt sich eine individuell leicht unterschiedliche Balance zwischen Virus und Wirt ein, erkennbar an der Menge der ständigen Virusproduktion und der Zahl der latent infizierten B-Lymphozyten.

In diesen latent infizierten B-Lymphozyten persistiert die EBV-DNA meist als Episom. Nur ein geringer Teil der DNA wird in cytoplasmatische mRNA transkribiert - die Gene, die für den latenten Status charakteristisch sind. Solche EBV-haltigen immortalisierten B-Lymphozyten (etwa jeder zehntausendste der Gesamtpopulation) sind nach der Primärinfektion lebenslang im Körper nachweisbar. Sie werden durch die T-Zell-vermittelte körpereigene Abwehr unter Kontrolle gehalten. Werden diese Lymphozyten daher in vitro von den T-Zellen

getrennt, wachsen sie zu permanenten Zelllinien aus. Der gleiche Effekt kann im Körper auftreten, wenn die körpereigene Abwehr geschwächt wird (z.B. bei Transplantationspatienten), oder aufgrund genetischer Defekte zur vollständigen Kontrolle nicht in der Lage ist (X-linked lymphoproliferative syndrome - XLP) - es kommt zu polyklonalen Lymphomen. Auch in vitro lassen sich Lymphozyten von Menschen und Primaten mit Epstein-Barr Virus immortalisieren. Nach Inkubation von Nabelschnurlymphozyten (diese werden meist verwendet, da sie sicher noch keinen Kontakt mit dem Virus hatten) mit Virus aus Zellkulturüberständen oder natürlichen Quellen entstehen permanent wachsende, EBV-DNA enthaltende, lymphoblastoide Zelllinien.

In der Serologie unterscheidet man aus historischen Gründen und aufgrund des als Antigen zur Verfügung stehenden Materials Antikörper gegen Virus-Kapsid-Antigen (VCA) - Proteine, die nach der Replikation der DNA produziert werden, Membranantigen (MA) - Proteine, die im Envelope lokalisiert sind, frühes Antigen (EA) - Proteine, die vor der Replikation der DNA produziert werden und das Epstein-Barr Virus assoziierte nukleäre Antigen (EBNA). EA konnte weiter unterteilt werden in das diffuse frühe Antigen - EA-D und das restricted (eingeschränkte) frühe Antigen - EA-R (Henle et al 1971). In der Immunfluoreszenz ist EA-D auch nach Methanolfixierung im Zellkern und im Cytoplasma nachweisbar, während EA-R auf das Cytoplasma beschränkt ist und durch Methanol zerstört wird. EBNA kann durch antikomplementäre Immunfluoreszenz im Zellkern aller EBV-transformierten Zellen nachgewiesen werden. Bei dieser Methode binden Komplement-Faktoren an Antigen-Antikörper-Komplexe und werden wiederum mit markierten Antikomplement-Antikörpern identifiziert, wodurch ein Verstärkungseffekt erreicht wird. Als weiteres Antigen gibt es noch das lymphocyte detected membrane antigen (von Lymphozyten erkanntes Membranantigen - LYDMA), ein Membranprotein, gegen das Antikörper im Körper bisher nicht nachgewiesen werden konnten, aufgrund dessen die zelluläre Immunabwehr jedoch infizierte B-Lymphozyten erkennen und eliminieren kann. Die im Körper zirkulierenden, latent infizierten B-Lymphozyten exprimieren wahrscheinlich ebenso wie die daraus ausgewachsenen lymphoblastoiden permanenten Zelllinien nur EBNA und

LYDMA. Während der akuten Primärinfektion weisen die Patienten Antikörper nur gegen VCA und EA auf. Nach Ablauf der Infektion werden Antikörper gegen MA und EBNA nachweisbar und persistieren dann wie die Antikörper gegen VCA lebenslang, während die Antikörper gegen EA nach einigen Monaten nicht mehr nachweisbar sind.

Aufgrund serologischer Daten (hohe Antikörpertiter gegen VCA, EA und MA) wurde die Korrelation von zwei Tumorerkrankungen des Menschen - des Burkitt Lymphoms und des Nasopharynx-Karzinoms - mit dem Epstein-Barr Virus postuliert (Übersichtsartikel in Epstein und Achong 1979). Das Burkitt Lymphom tritt vorwiegend bei Kindern in tropischen Regionen Afrikas auf. In Afrika sind 97% der Burkitt Lymphome mit Epstein-Barr Virus assoziiert, d.h. die Patienten haben erhöhte Antikörpertiter, in allen Tumorzellen befindet sich EBV-DNA, und die Tumorzellen exprimieren EBNA. Außerhalb Afrikas sind dagegen 75% aller Burkitt Lymphome EBV-negativ. Aufgrund der verschiedenen absoluten Zahlen ist die Inzidenz eines EBV-negativen Burkitt Lymphoms überall auf der Welt wahrscheinlich ähnlich. In Afrika dagegen bedingen unbekannte Faktoren, die anscheinend mit dem Epstein-Barr Virus in Verbindung stehen, die Entstehung der großen Zahl der EBV-positiven Burkitt-Lymphome. Alle bisher untersuchten Burkitt Lymphome, auch die EBV-negativen, weisen spezifische Chromosomentranslokationen auf, deren genaue Funktion bei der Erkrankung jedoch noch unklar ist.

Das Nasopharynx-Karzinom tritt am häufigsten in Südchina auf, wo es mit bis zu 40 Fällen pro 100 000 Einwohner pro Jahr und einem akkumulierten Risiko von etwa 1% die häufigste Tumorart des Menschen ist. In Europa treten etwa 0,3 Fälle pro 100 000 Einwohner pro Jahr auf. Im Falle des Nasopharynx-Karzinoms handelt es sich bei den Tumorzellen um Epithelzellen. EBV-DNA und EBNA konnte regelmäßig in allen bisher untersuchten NPC-Zellen gefunden werden (Wolf et al 1973, Desgranges et al 1974, Klein et al 1974b, Andersson-Anvert et al 1977). Da trotz vieler Bemühungen bisher noch keine EBV-Rezeptoren auf Epithelzellen gefunden werden konnten, erhebt sich die Frage, wie das Virus in die Epithelzellen gelangt. Da latent infizierte B-Lymphozyten nach Aktivierung des Virus mit EBV-negativen Zellen fusionieren können (Bayliss und Wolf 1980, Bayliss und Wolf 1981a), ist die Fusion von

Epithelzellen und EBV-haltigen aktivierten B-Lymphozyten in der Region des Nasopharynx, in der beide Zellarten in engem Kontakt miteinander stehen, ein möglicher Weg. Aktivierende Substanzen sind beispielsweise Buttersäure (eventuell von Bakterien im Rachenraum produziert) oder Inhaltsstoffe einer ganzen Reihe von Pflanzen, die teilweise als Nahrungs- oder Heilmittel (z.B. Tee) verwendet werden und direkt oder über den Blutkreislauf in den Nasenrachenraum gelangen können (Ito et al 1981, Hirayama und Ito 1981, Zeng Yi et al 1983).

Das onkogene Potential des Epstein-Barr Virus zeigt sich auch darin, daß mit EBV-Präparationen aus einer Zelllinie, die von einem Burkitt Lymphom abstammt, Tumore in Liszt-Affchen (*Saguinus oedipus oedipus*) erzeugt wurden (Shope et al 1973). Auch mit Virus, das von einem Patienten mit infektiöser Mononukleose abstammt, konnten in Versuchstieren Tumore erzeugt und EBV-DNA in den Tumoren nachgewiesen werden (Wolf et al 1974, Werner et al 1975).

Zur Vermehrung des Epstein-Barr Virus in Kultur gibt es kein vollständig lytisches Zellsystem. Aus Burkitt Lymphomen ausgewachsene Zelllinien, in vivo immortalisierte B-Lymphozyten, die nach Isolierung proliferierten, oder mit Virus aus Rachenspülwasser oder Zellkulturüberständen in vitro transformierte B-Lymphozyten von Menschen oder Affen sind - abgesehen von in Bakterien kloniertem Material - die einzige Quelle für Virus-DNA oder Virusproteine. In den meisten dieser so erhaltenen permanent wachsenden lymphoblastoiden Zelllinien verharret das Virus im latenten Stadium. Die Zellen enthalten meist etwa 5 - 50 episomale EBV-Genome und exprimieren lediglich die für die Latenz charakteristischen Antigene EBNA und LYDMA. Die lange fragliche Integration von EBV-DNA ins zelluläre Genom konnte kürzlich zumindest im Fall von zwei Zelllinien eindeutig positiv beantwortet werden (Henderson et al 1983, Matsuo et al 1984).

In einigen Zelllinien produziert ein geringer, stets gleichbleibender Anteil der Zellen (maximal etwa 5%) infektiöse Partikel und damit das ganze Spektrum an frühen und späten Proteinen, der Rest verharret in der Latenz. Durch eine Reihe von Substanzen (zur Hausen und Bauer 1983), vor allem durch Buttersäure (Luka et al 1979) und Phorbol ester (zur Hausen et al 1978), läßt sich der Anteil der produzierenden Zellen

steigern. Viele Zelllinien enthalten dann jedoch nach wie vor nur einige Prozent produzierende Zellen, während einzelne bis zu 75% VCA-positive Zellen aufweisen (zur Hausen et al 1978). Auch einige der nicht spontan Virus-produzierenden Zelllinien können durch diese Substanzen zur Produktion angeregt werden. Die am häufigsten verwendeten Zelllinien sind P3HR1 (Pulvertaft 1964) und B95-8 (Miller et al 1972), zwei spontan produzierende Zelllinien, die sich massiv induzieren lassen. Raji (Pulvertaft 1965), eine Zelllinie, die uninduziert nur die latenten Genprodukte exprimiert, ist ebenfalls massiv induzierbar, wobei sie die Besonderheit aufweist, daß nur frühe Proteine exprimiert werden - möglicherweise als Folge der Deletion eines frühen Gens (Kallin und Klein 1983). Raji und P3HR1 stammen aus Burkitt Lymphomen, während B95-8 mit Virus aus der Zelllinie 833L, die von einem Patienten mit infektiöser Mononukleose abstammt (Blacklow et al 1971), in vitro transformierte Marmoset-Lymphozyten sind. P3HR1-Viren weisen zwei Besonderheiten auf. Zum einen können sie Lymphozyten nicht mehr transformieren, zum anderen kann man sie dazu verwenden, durch Infektion von EBV-negativen Lymphozyten oder durch Superinfektion von latent EBV-haltigen Zellen die Produktion viraler Proteine anzuschalten. Das gebräuchlichste System hierzu ist die Superinfektion von Raji-Zellen. Der Vorteil liegt darin, daß ein hoher Prozentsatz der Zellen weitgehend synchron den Zyklus der Virusreplikation durchläuft und so die zelluläre Proteinsynthese weitgehend abgeschaltet wird. Dadurch kann die zeitliche Abfolge der Produktion der einzelnen Virusproteine untersucht werden. Diese sind durch den fehlenden Background (Hintergrund) der zellulären Proteine auch leichter identifizierbar als in den produzierenden Zelllinien, in denen auch nach Induktion Zellen, die sich in allen Stadien der Virusreplikation sowie in der latenten Phase befinden, gleichzeitig vorhanden sind.

3. Die DNA des Epstein-Barr Virus

Die EBV-DNA ist etwa 185 000 Basenpaare lang und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 58% auf. In den Virionen liegt sie linear vor mit direkten Repetitionen von etwa 500 Basenpaaren (bp) an den Enden, die in unterschiedlicher Anzahl bei den einzelnen DNA-Molekülen vorzufinden sind (Given et al 1979, Kintner und Sugden 1979, Bankier et al 1983b). Durch diese Repetitionen können die Enden fusionieren - in den latent infizierten Zellen liegt die DNA als kovalent geschlossener Zirkel vor. Des weiteren gibt es eine große Anzahl von internen Repeat-Strukturen, von denen die kleineren jedoch erst durch die inzwischen erfolgte vollständige Sequenzierung des Genoms (Baer et al 1984) bekannt wurden. Am auffälligsten ist der große interne Repeat (BamH1 W Fragment, siehe Abb.1), bei dem etwa 3000 Nukleotide (Cheung und Kieff 1982, Jones und Griffin 1983) bis zu elfmal in Tandemstellung wiederholt werden. Die Anzahl der Repeats differiert in den einzelnen Zelllinien, wobei auch inkomplette Repeats auftreten. Innerhalb dieses großen Repeats finden sich wiederum eine Anzahl von kleineren Repeat-Strukturen.

Im BamH1 K Fragment liegt ein im Falle des B95-8 Stammes 708 Basenpaare langer Repeat, der aus wechselweise kombinierten Wiederholungen der Triplets GGG, GCA und GGA besteht (Heller et al 1982a). Dieser Repeat hybridisiert mit der DNA aller menschlichen Chromosomen, mit Ausnahme des Y-Chromosoms (Heller et al 1982b). Einige dieser kreuzhybridisierenden zellulären Sequenzen, die im wesentlichen aus Wiederholungen des Triplets GGA bestehen, sind inzwischen kloniert und sequenziert (Heller et al 1985).

Im BamH1 H und B' Fragment befinden sich Wiederholungen einer untereinander ähnlichen 124 bzw. 103 Nukleotide langen Einheit - der Not1 bzw. Pst1 Repeat. Jeweils unmittelbar benachbarte Sequenzen weisen hohe Homologie zueinander auf (Hudewentz et al 1982, Dambaugh und Kieff 1982, Freese et al 1983, Jeang und Hayward 1983). Der GC-Gehalt beider Repeat-Strukturen liegt bei 84%.

Die DNA der bisher untersuchten Stämme weist charakteristische

Deletionen, Insertionen und Restriktionsspaltmuster auf, die sie von allen anderen Stämmen unterscheidet. Eine Korrelation von DNA-Variationen mit einzelnen Erkrankungen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Heterogenität der DNA scheint eine generelle Eigenschaft der Herpesviren zu sein. Cytomegalieviren zeigen eine sehr ausgeprägte Stammheterogenität - unabhängige Isolate differieren in mindestens 40% ihrer 6bp-Restriktionsenzym-Schnittstellen (Hayward et al 1984). Ebenso zeigten 80 untersuchte Herpes Simplex Virus Typ 1 Isolate ein jeweils charakteristisches Restriktionsspaltmuster (Spear und Roizman 1980). Durch die Persistenz der Herpesviren bleiben anscheinend Mutationen, soweit sie nicht letal sind, erhalten und vermehren sich durch Infektion weiter. Diese Mutationen treten mit normaler Häufigkeit auf, da Isolate von Rekurrenzen selbst nach langer Zeit noch identisch mit den Viren der Primärinfektion sind. Die als Prototyp angesehene EBV-DNA ist also die jeweils in der Mehrzahl der Stämme auftretende Form und enthält alle Sequenzen, die in den einzelnen Stämmen deletiert sind.

Die DNA der am häufigsten verwendeten Stämme weist nun einige über das Maß der normalen Abweichung hinausgehende Unregelmäßigkeiten auf. Man muß jedoch berücksichtigen, daß diese Stämme eben bisher am ausgiebigsten untersucht wurden. P3HR1 weist eine Deletion von etwa 6,5kbp auf, die Einheiten des großen internen Repeats, sowie das BamH1 Y Fragment und den Teil des BamH1 H Fragments bis zum Not1 Repeat umfaßt (Raab-Traub et al 1978, Bornkamm et al 1980, Heller et al 1981, King et al 1982, Bornkamm et al 1982, Hayward et al 1982, Jeang und Hayward 1983, Jones et al 1984). Zusätzlich existieren kleinere Deletionen im BamH1 L (ca. 80bp), K (ca. 150bp) und I'W' (ca. 370bp) Fragment. Insertionen von etwa 100 bzw. 1700 Nukleotiden befinden sich im BamH1 P und E Fragment - jeweils relativ zu B95-8 und FF41 (Rabson et al 1982).

Die B95-8-DNA weist eine Deletion von etwa 13kbp auf, die einen Teil des BamH1 B', das BamH1 W' und einen Teil des BamH1 I' Fragments umfaßt (Raab-Traub et al 1980, Bornkamm et al 1980, Heller et al 1981). Die fusionierten verbliebenen Teile der BamH1 Fragmente B' und I' bilden das BamH1 I Fragment. Eine Insertion von etwa 150 Nukleotiden findet

sich im Hind3 I1 Fragment, das zentral in den BamH1 Fragmenten Z und R liegt (Bornkamm et al 1980). Die Raji-DNA schließlich weist eine Deletion von 2,4kbp in den BamH1 Fragmenten A und N auf, sowie eine von 3,15kbp, die vom BamH1 E in das BamH1 Z Fragment reicht und die die drei Fragmente BamH1 e1, e2, e3 beinhaltet (Pollack et al 1984a).

Generell ist durch die unterschiedliche Größe des im BamH1 K Fragment kartierenden EBNA 1 Proteins in einer Reihe von Zelllinien (Hennessy et al 1983a) dokumentiert, daß die Anzahl der Repeat-Einheiten von Stamm zu Stamm unterschiedlich und dieses Fragment dadurch verschieden groß ist.

Es wurde mehrfach berichtet, daß die DNA-Populationen in einzelnen Stämmen nicht einheitlich sind. So scheint jeweils ein Teil der Raji-Genome im BamH1 Jhet und O Fragment Unregelmäßigkeiten aufzuweisen (Rymo et al 1981). In P3HR1 und einigen anderen Zelllinien (Heller et al 1981) existieren defekte EBV-DNA-Moleküle. Durch Subklonierung konnten P3HR1-Klone erhalten werden, die diese defekten DNA-Moleküle, auch het-DNA genannt, verloren haben. Mit dieser het-DNA scheint die Fähigkeit der P3HR1-Zellen spontan in den lytischen Zyklus einzutreten, sowie diesen nach Superinfektion zu induzieren, korreliert zu sein (Heston et al 1982, Rabson et al 1983, Miller et al 1984a). Die het-DNA ist eine einheitliche Population aus vier definierten, normalerweise voneinander getrennten Teilen der EBV-DNA, die Head/Head sowie Tail/Tail verknüpft als Einheit mehrfach hintereinander geschaltet sind, um die für die Verpackung notwendige DNA-Länge zu erreichen (Cho et al 1984a).

4. Die Expression des Epstein-Barr Virus

In den latenten lymphoblastoiden Zelllinien werden, wie erwähnt, nur EBNA und LYDMA als Antigene exprimiert. Übereinstimmend wurden in mehreren Arbeiten Transkripte von drei distinkten Regionen mit Polyribosomen assoziiert gefunden - BamH1 WYH, BamH1 K und BamH1 Nhet (Powell et al 1979, King et al 1980, King et al 1981, van Santen et al 1981, Arrand und Rymo 1982). Jüngste Resultate, die teilweise noch umstritten sind, erbrachten die Analyse der Transkription und

Translation der drei latenten Gene EBNA 1, EBNA 2 und LYDMA.

Ein Leserahmen im BamH1 K Fragment, der den Repeat beinhaltet, kodiert für das sogenannte EBNA 1. Die Zahl der Repeats variiert in den einzelnen Zelllinien, als Konsequenz davon schwankt auch die Größe des EBNA 1 von 68 kd bis 85 kd (Hennessy et al 1983a). Der Repeat wird dabei als Abfolge von Glycin und Alanin ausgedrückt (Hennessy und Kieff 1983b). Das Protein ist als trans wirkender Faktor zur Replikation der EBV-DNA im latenten Stadium nötig (Yates et al 1985), die im Unterschied zur Replikation im lytischen Zyklus von der zellulären DNA-Polymerase erfolgt. Der Glycin-Alanin Repeat ist für diese Funktion jedoch nicht notwendig und kann ohne negative Auswirkungen deletiert werden.

Mit einigen Seren kann in latenten Zellen das sogenannte EBNA 2 identifiziert werden (Strnad et al 1981, Hennessy und Kieff 1983b). Vermutlich kodiert ein offener Leserahmen in den BamH1 Fragmenten Y und H für einen Teil dieses Proteins von etwa 85kd, das in der Größe ebenfalls variiert, jedoch nicht in dem Ausmaß wie EBNA 1 (Dambaugh et al 1984). Die Aminosäuresequenz aus dem Leserahmen enthält einen auffallend hohen Anteil an Prolin. Über die Beteiligung benachbarter offener Leserahmen im großen internen Repeat, sowie Lage und Anzahl der Promotoren liegen im Augenblick widersprüchliche Informationen vor (van Santen et al 1983, Bodescot et al 1984, Farrell persönliche Mitteilung). Es besteht prinzipiell auch die Möglichkeit, daß das Gen je nach Zellstadium unterschiedlich exprimiert wird. Dillner et al (1985) bestätigten die Lokalisation eines 85kd EBNA-Proteins in der BamH1 WYH-Region. Da das EBNA 2 Gen im transformationsnegativen P3HR1-Stamm deletiert ist, wurde postuliert, daß EBNA 2 in irgendeiner Weise an der Transformation beteiligt ist. Ein Hinweis dafür ist, daß Nachkommenviren der Superinfektion von Raji-Zellen mit P3HR1-Virus, die ebenfalls transformieren können (Yajima et al 1978, Fresen et al 1979), Rekombinanten aus beiden Virusgenomen sind, in denen der linke Teil des Genoms und damit das EBNA 2 Gen aus Raji stammt (Skare et al 1981). Berichte, wonach durch Rekombination des P3HR1-Genoms mit klonierter DNA der BamH1 YH-Region transformationskompetente Viren entstehen (Stoerker und Glaser 1983a, Stoerker et al 1983b), wurden stark

angezweifelt (Miller und Sugden 1985). Außer in P3HR1- und Daudi-Zellen, die ähnliche Deletionen aufweisen (Jones et al 1984), ist das 85kd-Protein jedoch auch in Jijoye-Zellen nicht zu entdecken. Jijoye-Zellen, aus denen P3HR1-Zellen durch Subklonierung entstanden, weisen eine kleinere Deletion im BamH1 H Fragment auf (King et al 1982, Rabson et al 1982), die den potentiellen EBNA 2 Leserahmen beinhaltet, sind jedoch noch transformationskompetent. Dies spricht gegen die Vorstellung einer Beteiligung des EBNA 2 Gens an der Transformation.

Nach Transfektion des BamH1 M Fragments in Maus L-Zellen wird ein weiteres Kernantigen, das alle Kriterien eines EBNA aufweist, exprimiert (Grogan et al 1983). Ein entsprechendes Transkript in latent infizierten Zellen konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden.

Im BamH1 Nhet Fragment liegt die dritte in latenten Zellen transkribierte Region. Eine mRNA von 2,8 kbp, die nach dem aussplices von zwei Introns drei auf DNA-Ebene durch nicht kodierende Sequenzen getrennte Leserahmen fusioniert, wurde präzise kartiert (Fennwald et al 1984, Hudson et al 1985). Mit Antiseren gegen das in Bakterien exprimierte Protein (Hennessy et al 1984) und gegen synthetische Peptide (Modrow persönliche Mitteilung) aus diesem Leserahmen konnte nachgewiesen werden, daß es sich um ein Membranprotein handelt, was bereits durch die Struktur der Aminosäurekette vermutet worden war. Das Protein ist darum möglicherweise LYDMA, das in der Zellmembran lokalisiert sein muß, um von Lymphozyten erkannt zu werden. Die Expression dieses Proteins ist in verschiedenen Zelllinien ziemlich uneinheitlich, wobei möglicherweise ein entscheidender Unterschied zwischen Zelllinien aus Burkitt Lymphomen und in vitro transformierten Lymphozyten besteht (Modrow persönliche Mitteilung). In der späten Phase der lytischen Expression wird von einem Promotor im zweiten Intron aus transkribiert und das Protein ohne die beiden Exons am Aminoende exprimiert (Hudson et al 1985). Dadurch werden vier von sechs potentiellen Transmembranregionen deletiert.

Über die Transkripte in latenten Zellen hinaus wurden für Polyribosomen-assoziierte mRNAs kodierende Regionen in induzierten Raji-Zellen grob kartiert (King et al 1981). Des weiteren wurde sowohl mit Tumormaterial aus Burkitt Lymphomen (Dambaugh et al 1979) als auch

aus Nasopharynx-Karzinomen (Raab-Traub et al 1983, Pagano et al 1983) versucht, die transkribierten Regionen des EBV-Genoms zu kartieren. Die Transkription eines Teils der Nasopharynx-Karzinome ähnelt, ebenso wie die der Burkitt Lymphome, der von latent infizierten Zellen, während andere Nasopharynx-Karzinome wie die induzierten Raji-Zellen einen großen Teil des Genoms transkribieren. Die Kartierung ist jedoch nicht fein genug, um über die Expression einzelner Gene Aussagen machen zu können.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden von mehreren Gruppen Daten zur Kartierung von Transkripten des lytischen Zyklus veröffentlicht. Aus induzierten B95-8-Zellen wurden frühe und späte mRNAs den BamHI Fragmenten zugeordnet (Hummel und Kieff 1982a, Shin et al 1983a, 1983b), und aus induzierten P3HR1-Zellen wurden mRNAs BamHI und EcoRI Fragmenten zugeordnet (Weigel und Miller 1983). Von Shin et al (1983b) und Nonoyama et al (1983) wurden zusätzlich immediate early transkribierte Regionen in superinfizierten Raji-Zellen und exprimierte Bereiche nach Infektion von Lymphozyten mit transformierendem Virus kartiert. Es ergab sich ein relativ komplexes Bild der Transkription des Epstein-Barr Virus, bei dem in den meisten Fragmenten mehrere, teils überlappende mRNAs gefunden wurden, die nur teilweise in allen Arbeiten einheitlich identifiziert wurden. Eine Zuordnung einzelner mRNAs zu den aus der Sequenzierung bekannten Leserahmen und Transkriptionssignalen ist nur in Ausnahmefällen möglich.

Nach dem Anschalten des lytischen Zyklus durch chemische Induktion oder Superinfektion wird nahezu das gesamte Genom transkribiert und etwa 40 Virusproteine können identifiziert werden. Durch die Superinfektion von Raji-Zellen mit P3HR1-Virus konnte die zeitliche Abfolge der Produktion der einzelnen Proteine untersucht werden (Feighny et al 1980, 1981, Bayliss und Wolf 1981b, 1982). Dabei ergab sich ein kaskadenförmiger Ablauf der Virusproteinsynthese ähnlich wie bei Herpes Simplex Virus Typ 1 (Hones und Roizman 1974). Durch die Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid gleichzeitig mit der Infektion der Zellen, werden die mRNAs für nur acht Proteine, die immediate early Proteine, transkribiert (Bayliss und Wolf 1981b, ebenso wie für die folgenden Daten). Nur diese können allein vom zellulären Transkriptionsapparat

produziert werden. Nach dem Aufheben der Cycloheximidhemmung und gleichzeitiger Hemmung weiterer Transkription durch Actinomycin D werden diese mRNAs translatiert, und die Proteine können nach Markierung identifiziert werden. Eines oder mehrere dieser Proteine sind dafür notwendig, daß die nächste Gruppe der EBV-Proteine produziert wird. Diese, die frühen Proteine, werden vor der Replikation der viralen DNA synthetisiert. Eines oder mehrere der frühen Proteine bewirken das Abschalten der Transkription der immediate early Proteine. Durch den Einbau von Aminosäureanaloga (Canavanin an Stelle von Arginin und Azetidin an Stelle von Prolin) wird die Funktion der Proteine gestört. So können immediate early Proteine, die Canavanin eingebaut haben, die Produktion der frühen Proteine nicht anschalten. Nach dem Auswaschen des Canavanins aus den Zellen und der Zugabe von Arginin ist die Produktion von neuer früher mRNA Voraussetzung für die Synthese der frühen Proteine, da deren Synthese bei Hemmung der Transkription durch Actinomycin D unterbleibt (Bayliss und Wolf in Vorbereitung). Die immediate early Proteine sind also zur Transkription der frühen mRNAs nötig und nicht etwa zur Translation bereits vorhandener früher mRNA. Durch die Aminosäureanaloga lassen sich immediate early Proteine und frühe Proteine weiter unterteilen in solche, die unter diesen Bedingungen produziert werden, und solche, die nicht produziert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß möglicherweise auch innerhalb dieser Gruppen die Synthese gestaffelt und in Abhängigkeit von vorherigen Phasen abläuft.

Nach der Replikation der Virus-DNA durch die virale DNA-Polymerase findet die Synthese der späten Proteine statt, die in erster Linie aus Strukturproteinen bestehen. Für den Übergang ist die Existenz von funktionsfähigen frühen Proteinen notwendig. Durch Phosphonoessigsäure (PAA) kann die virale DNA-abhängige DNA-Polymerase gehemmt und die lytische Replikation der Virus-DNA verhindert werden. Im Falle des Herpes Simplex Virus befinden sich nach Infektion mit niedriger Multiplizität und PAA-Hemmung nur wenige Virusgenome in der Zelle. Ein Teil der späten Gene wird unter diesen Umständen überhaupt nicht exprimiert, ein anderer Teil nur in sehr reduziertem Maß. Bei Infektion mit hoher Multiplizität werden vermehrt späte Proteine trotz

PAA-Hemmung produziert. Die vorhandene Menge an HSV-DNA bestimmt also die Produktionsrate der späten Proteine (Wolf und Roizman 1978, Spear und Roizman 1980). Bei der Superinfektion von Raji-Zellen mit P3HR1-Virus liegen bereits ca. 50 virale Genome in den Raji-Zellen vor, sowie zusätzlich ein funktionsfähiger Replikationsapparat für diese latenten Genome - EBNA 1 in Verbindung mit einem kartierten Origin (Anfangspunkt) und der zellulären DNA-Polymerase (Yates et al 1985). Darum werden trotz Hemmung der viralen DNA-Polymerase mit PAA späte Proteine in einem gewissen Ausmaß synthetisiert, und es können nach Superinfektion und PAA-Hemmung nicht alle späten Proteine als solche identifiziert werden.

Nach radioaktiver Markierung von induzierten P3HR1-Zellen (Mueller-Lantzsch et al 1979, Kallin et al 1979, Kawanishi et al 1981a, Edson und Thorly-Lawson 1981) und induzierten Raji-Zellen (Mueller-Lantzsch et al 1979, Kawanishi et al 1981b, Bayliss et al 1983, Kallin und Klein 1983) konnten ebenfalls eine Reihe von EBV-Proteinen identifiziert werden. In Raji-Zellen werden keine späten Proteine produziert und zumindest eines der frühen (p138), in dessen Gen eine Deletion liegt, ebenfalls nicht. Durch Immunpräzipitation mit Patientenseren ist es möglich, die meisten in Zeitversuchen beschriebenen Proteine als virusspezifisch zu identifizieren. Mit EA und VCA positiven sowie EA negativen VCA positiven Seren konnten einige Proteine dem frühen Antigenkomplex zugeordnet werden.

In den verschiedenen Zelllinien und in superinfizierten Raji-Zellen sind die meisten Virus-Proteine vergleichbar, bei einigen bestehen jedoch qualitative oder quantitative Unterschiede. Dies hat eine Reihe von Ursachen:

- Bedingt durch Mutationen (am auffälligsten sind die großen Deletionen) werden einzelne Proteine nicht produziert. Bei Herpes Simplex Virus gibt es Mutanten, die in einem Gen defekt und trotzdem in der Zellkultur voll lebensfähig sind. Die Defekte können beispielsweise viruskodierte Enzyme des Nukleotidstoffwechsels betreffen, die für die Replikation nicht absolut notwendig sind.

- Ähnlich wie die erwähnte Heterogenität der DNA bezüglich des Restriktionsenzymspaltmusters, das für jeden einzelnen Stamm

charakteristisch ist, gibt es auch auf der Ebene der Proteine eine gewisse Heterogenität. 8 von 44 untersuchten HSV-Proteinen (Morse et al 1978) bzw. 7 von 23 (Pereira et al 1976) variieren im Molekulargewicht in den einzelnen Stämmen. Ähnliche Variationen sind auch beim Epstein-Barr Virus zu erwarten und wurden in dieser Arbeit auch nachgewiesen.

- In den einzelnen Stämmen kann es auch zu quantitativen Unterschieden in der Expression einzelner Proteine kommen, die bis zum Verschwinden einzelner Proteine unter die Nachweisgrenze reichen können.

Aufgrund des komplexen Virus-Wirt-Systems können unter den jeweiligen Versuchsbedingungen teilweise unterschiedliche Populationen an Proteinen exprimiert werden. Auch die Modifikationen können in einzelnen Versuchen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden sein. Durch die relativ große Anzahl der Proteine, die Heterogenität und ihre teilweise sehr geringe Produktion ist die weitere Charakterisierung in ihrer Gesamtheit erschwert. Spezifische Seren für einzelne Proteine oder Monoklonale Antikörper würden weitere Untersuchungen sehr erleichtern.

5. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Herpesviren sind ein interessantes Objekt, um die Regulation der Genexpression in Eukaryontenzellen zu untersuchen. Die koordiniert ablaufende, kaskadenförmige Regulation der Proteinsynthese während des lytischen Zyklus, die Unterdrückung des lytischen Zyklus in latenten Zellen, die Vorgänge beim Übergang der latenten Zellen zur Virusproduktion nach Induktion, sowie die Transformation und Unterdrückung des lytischen Zyklus in den Tumorzellen bieten die Möglichkeit, grundlegende Erkenntnisse zu gewinnen. Außerdem besitzt das Epstein-Barr Virus medizinische Bedeutung und durch neue Ergebnisse zur Biologie des Epstein-Barr Virus können Fortschritte in der Diagnostik und Therapie von EBV-assoziierten Erkrankungen erwartet werden.

Nachdem die vom Epstein-Barr Virus kodierten Proteine identifiziert und

charakterisiert (siehe A.4.) und die EBV-DNA vollständig in Bakterien kloniert worden war (Skare und Strominger 1980, Dambaugh et al 1980, Buell et al 1981, Arrand et al 1981), sollten in dieser Arbeit die kodierenden Regionen der Proteine auf dem Genom kartiert werden. Dabei sollte die Kartierung bis auf die Ebene der Leserahmen (von der Arbeitsgruppe von B.Barrell in Cambridge wurde parallel das gesamte Genom sequenziert und offene Leserahmen durch Computeranalyse identifiziert) erfolgen, um Promotoren, Transkription und Processing (Modifizierung) der mRNA, sowie die Translation von einzelnen Genen, die aus biologischen oder medizinischen Gründen von Bedeutung sind, untersuchen zu können. Des weiteren sollten für die Diagnostik relevante Proteine kartiert werden, diese dann von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Bakterien exprimiert und die so gewonnenen Proteine als Antigen in der Diagnostik verwendet werden. Inzwischen wurden Vertreter mehrerer Antigenklassen in Bakterien exprimiert. Nach vorläufigen Ergebnissen kann dadurch eine erhebliche Verbesserung der Diagnostik erreicht werden.

Da es durch das fehlende lytische Zellsystem nicht möglich ist, Proteine durch genetische Versuche zu kartieren, ist die Methode der hybrid selected Translation (Translation durch Hybridisierung selektionierter RNA) am besten geeignet. Dabei wird eine EBV-mRNA-Gesamtpopulation gegen einzelne Fragmente der EBV-DNA hybridisiert. Nur die von diesem Fragment transkribierten mRNAs binden und können dadurch selektiv in vitro translatiert werden. Die translatierten Proteine werden in SDS-Polyacrylamid-Gelen analysiert, und so können die Regionen, von denen die mRNAs der einzelnen Proteine transkribiert werden, identifiziert werden.

RNAs aus superinfizierten Raji-Zellen, die jeweils mit Cycloheximid oder Phosphonoessigsäure gehemmt worden waren, bzw. aus ungehemmten Zellen, wären die beste Möglichkeit, immediate early, frühe und späte Proteine zu kartieren. Da für die Superinfektion von 1 ml Raji-Zellen jedoch das aus etwa 100 ml P3HR1-Zellen isolierte Virus nötig ist, kann die für die Kartierung nötige Menge an RNA nicht mit vertretbarem Aufwand aus superinfizierten Raji-Zellen gewonnen werden. Deshalb wurden induzierte P3HR1-Zellen gewählt, um das Spektrum aller Proteine

zu kartieren, induzierte Raji-Zellen, um zumindest den überwiegenden Teil der frühen Proteine und induzierte Raji-Zellen, die mit Cycloheximid gehemmt wurden, um die immediate early Proteine zu kartieren. RNA aus uninduzierten Raji-Zellen und aus BJA-Zellen, einer EBV-negativen lymphoblastoiden Zelllinie (Klein et al 1974a), sollte als Kontrolle und zur eventuell möglichen Identifizierung der latenten Genprodukte dienen. Stammspezifische Unterschiede in der Expression, die größtenteils noch nicht dokumentiert sind, sollten erfaßt und kartiert werden, um mögliche Auswirkungen auf das biologische Verhalten untersuchen zu können.

Ein großes Problem bei der Kartierung durch hybrid selected Translation besteht darin, daß nur primäre Translationsprodukte kartiert werden, nicht die prozessierten Proteine, die nach in vivo Markierung identifiziert werden. Letztere wurden jedoch bereits im Hinblick auf medizinische und biologische Relevanz untersucht, so daß die Zuordnung der in vitro translatierten zu den in vivo markierten Proteinen allein schon aus diesen Gründen erstrebenswert ist. Bei Herpes Simplex Virus Typ 1 wurde durch Pulse-chase Experimente (zeitlich aufeinanderfolgende Inkubation mit radioaktiven und nicht radioaktiven Substanzen) festgestellt, daß 16 von 44 Proteinen derart posttranslational modifiziert werden, daß sich ihr Laufverhalten in SDS-Polyacrylamid-Gelen ändert (Morse et al 1978). Ein bloßer Vergleich der Molekulargewichte ist also nicht ausreichend für die Zuordnung der Proteine. Die geeignetste Methode hierfür ist die vergleichende Immunpräzipitation durch Monoklonale Antikörper oder monospezifische Seren. Solche gibt es jedoch nach wie vor nur für sehr wenige EBV-Proteine. Deshalb sollte in dieser Arbeit versucht werden, mit Hilfe von Patientenseren, die jeweils nur gegen einen Teil der EBV-Proteine Antikörper aufweisen, durch vergleichende Immunpräzipitation Proteine zuzuordnen. Diese Methode ist jedoch naturgemäß in ihrer Aussagekraft beschränkt.

Bei der Auswertung der Kartierungsexperimente fiel eine bestimmte Region des EBV-Genoms - die BamHI Z Region - durch ausgeprägte Heterogenität auf. In Raji-Zellen ist ein Teil der entsprechenden DNA deletiert und mehrere dort kodierende primäre Translationsprodukte

wiesen in Raji- und P3HR1-Zellen verschiedene Molekulargewichte auf. Außerdem konnte keines der dort kartierten Proteine einem nach in vivo Markierung erhaltenen Protein zugeordnet werden. Die Region ist auch ziemlich exakt in den defekten DNA-Molekülen des P3HR1-Stammes enthalten (Cho et al 1984a, 1984b, Miller et al 1985), die eine Rolle bei der Induktion des lytischen Zyklus spielen.

Deshalb sollten Transkription und Translation dieser Region in verschiedenen Zellen genau untersucht werden. Durch Expression der offenen Leserahmen in *E. coli* und Immunisierung von Kaninchen mit den gewonnenen Proteinen sollten monospezifische Seren erhalten werden, mit denen die fehlenden, vermutlich posttranslational modifizierten Proteine nach in vivo Markierung identifiziert werden sollten. Durch die umfassende Analyse einer detaillierten Region unter Berücksichtigung der Sequenzdaten sollte schließlich die Aussagekraft der durch hybrid selected Translation erhaltenen Daten zur Kartierung des Epstein-Barr Virus überprüft werden.

B. Material und Methoden

1. Biologisches Material

Alle verwendeten Zelllinien stammten aus den Beständen des Max von Pettenkofer-Instituts, wo sie regelmäßig überprüft und für sämtliche Versuche und diagnostischen Tests eingesetzt werden.

Die Charon4A-Phagen, in denen jeweils ein geschertes EBV-DNA Fragment kloniert ist (EB0-8 bis EB90-99) (Buell et al 1981), sowie E. coli DP50 supF wurden von G.Buell und B.Sugden zur Verfügung gestellt.

Die klonierten BamH1-Fragmente der EBV-DNA (BamH1 A bis b, BamH1 d, e) (Skare und Strominger 1980) wurden von J.Skare und J.Strominger zur Verfügung gestellt.

Der Klon pSL76, der zwei BamH1 W Fragmente in Tandemstellung enthält (Hayward et al 1982), wurde von D.Hayward zur Verfügung gestellt.

Das vollständige EBV-Genom aus M-ABA-Zellen, kloniert in pHc79 Cosmiden, sowie Subklone daraus, die die Deletion in B95-8-DNA überspannen (H3D2, H3D1, H3K2) und ein Klon, der die fusionierten Enden aus zirkulärer EBV-DNA enthält (966-20), wurden von H.Polack und G.Bornkamm zur Verfügung gestellt (Polack et al 1984b).

Kurze EBV-DNA Fragmente kloniert in M13 mp8 und mp9 zur Feinkartierung einzelner Leserahmen wurden von P.Farrell und B.Barrell zur Verfügung gestellt.

Von M.Motz aus der Arbeitsgruppe stammten Klone, die das BamH1 A Fragment weiter unterteilen (pM311, pM356 und pM635).

Die verwendeten Vektoren und Bakterien zur Klonierung stammten von U.Rüther und B.Müller-Hill (pUR278 - pUR292) (Rüther und Müller-Hill 1983), J.Messing (M13 mp8, pUC8 - pUC19) (Messing und Vieira 1982, Vieira und Messing 1982, Norrander et al 1983) und Y.Masui (PINIIB) (Masui et al 1984).

Die zur Immunpräzipitation verwendeten Patientenseren stammten aus der diagnostischen Abteilung des Max von Pettenkofer-Instituts. Seren von Kaninchen, die mit ganzen Zellen und gentechnologisch hergestellten

EBV-Proteinen immunisiert worden waren, wurden von W.Jilg und M.Motz aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Der Monoklonale Antikörper R3 gegen das EBV-Protein p54 stammt von G.Pearson (Pearson et al 1983).

2. Isolierung von Nukleinsäuren

2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Bakterien wurden in 400ml L-Broth (10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl pro l) mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C großgezogen.

2.1.1. SDS-Methode

Zur Isolierung großer Plasmide, vor allem aber zur Isolierung der Cosmide, wurde diese Methode benutzt (nach Maniatis et al 1982).

Die Bakterien wurden 10Min. bei 5000 rpm in einem A6.9 oder A6.14 Rotor (Kontron) abzentrifugiert und das Pellet in 8ml einer kalten 10% Sucrose in 50mM Tris (pH 8,0) Lösung aufgenommen. 2ml einer frisch angesetzten Lysozym-Lösung (10mg/ml in 0,25M Tris pH 8,0) und 8ml 0,25M EDTA wurden zugegeben, der Inhalt durchmischt und die Röhrchen 10Min. bei 0°C inkubiert. Danach wurden 2ml 20% SDS zugegeben, gemischt, 5ml 5M NaCl zugegeben, erneut gemischt und das Bakterienlysate mindestens 1h bei 0°C inkubiert. In einem T65.13 Rotor (Kontron) wurde das Lysat 30Min. bei 30 000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (48/48/4) und einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol ausgefällt, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und lyophilisiert. Die DNA wurde entweder in TE-Puffer (10mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA) aufgenommen und zum Verdau mit Restriktionsenzymen verwendet, oder durch Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation weiter gereinigt. Dazu wurde die lyophilisierte DNA in Caesiumchlorid-Lösung der Dichte 1,55g/ccm aufgenommen, mit 200µl Ethidiumbromid (10mg/ml) pro Röhrchen

gemischt und der Refraktationsindex auf 1,3860 eingestellt. Die Röhrchen wurden ca. 70h in einem TFT65.13 Rotor bei 35 000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Plasmidbande mit einer Kanüle entnommen. Das Ethidiumbromid wurde durch dreimaliges Ausschütteln mit Isopropanol, das mit einer 5M NaCl-Lösung gesättigt worden war, entfernt. Nach mindestens 2h Dialyse gegen TE-Puffer wurde die Plasmid-DNA Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in TE-Puffer aufgenommen.

2.1.2. Alkali-Methode (nach Maniatis et al 1982)

Die Bakterien wurden abzentrifugiert und das Pellet in 8ml frischer Lysozym-Lösung (5mg/ml Lysozym in 50mM Glucose, 25mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA) aufgenommen und 5Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 16ml einer frischen 0,2N NaOH, 1% SDS Lösung zugegeben, gemischt und 10Min. bei 0°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 12ml einer 3M K⁺, 5M Acetat Lösung (pH 4,8) gemischt und danach erneut 10Min. bei 0°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 20Min. bei 17 000 rpm und 4°C in einem A8.24 Rotor wurde der Überstand mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (48/48/4) und Chloroform ausgeschüttelt und die DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol oder 2 Vol. Ethanol gefällt. Danach wurde die DNA wie in B.2.1.1. beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.3. Alkali-Methode zur Schnellanalyse (Maniatis et al 1982)

Zur schnellen Analyse der DNA rekombinanter Klone wurde die Alkali-Methode in kleinen Volumen durchgeführt. 1,5ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden 1Min. mit einer Eppendorf-Zentrifuge in einem Reaktionsgefäß pelletiert und das Pellet in 100µl einer kalten Lösung aus 50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris pH 8,0, 4mg/ml Lysozym suspendiert. Nach 5Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200µl einer frischen 0,2N NaOH, 1% SDS Lösung zugemischt und die Reaktionsgefäße 5Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 150µl einer kalten Lösung aus 3M K⁺, 5M Acetat (pH 4,8) zugegeben, gemischt und

erneut 5Min. auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 5Min. in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (48/48/4) ausgeschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde mit 2 Vol. Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 50µl TE-Puffer aufgenommen. 10 - 20µl der Lösung wurden zur Charakterisierung durch Verdau mit Restriktionsenzymen verwendet.

2.2. Isolierung von DNA aus Charon4A-Phagen

Die Charon4A-Phagen wurden in E. coli DP50 supF vermehrt. Dieser Stamm benötigt als Medium NZYDT 2x: 20g NZ-Amine A (Hum-Co, Sheffield Division of Kraftco Corp.), 10g Hefeextrakt, 10g NaCl, 4g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pro l, 200µg/ml Diaminopimelinsäure, 80µg/ml Thymidin, 200µg/ml Maltose. Zur Titerbestimmung der Phagenstocks wurden 0,1ml der jeweiligen Verdünnung der Phagensuspension mit 0,1ml einer Übernachtskultur und 0,1ml einer 10mM $MgCl_2$, 10mM $CaCl_2$ Lösung gemischt und 20Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 3ml Softagar (NZYDT 2x + 6,5g/l Agar) dazugemischt und auf Platten mit Grundagar (11g/l Agar) gegossen.

Zur Phagenisolierung wurden ca. 2×10^9 Phagen mit 5ml 10mM $MgCl_2$, 10mM $CaCl_2$ und 5ml Übernachtskultur gemischt. Nach der Adsorptionszeit von 20Min. bei 37°C wurde die Suspension mit 350ml NZYDT 2x bei 31°C für 24h leicht geschüttelt. Danach wurden ca. 2ml Chloroform dazupipettiert und die Kultur bei 4°C mindestens 1h aufbewahrt. Nach der Inkubation mit 1µg/ml DNase für 1h bei 4°C wurde die Lösung auf 1M NaCl gebracht und 30Min. bei 7500 rpm und 4°C in einem A6.9 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde mindestens 2h mit Polyethylenglykol (PEG) 6000 (70g/l) bei 4°C verrührt. Nach der Adsorption der Phagen an das PEG wurde dieses 30Min. bei 7500 rpm und 4°C in einem A6.9 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in ca. 5ml 10mM Tris pH 7,4, 10mM $MgCl_2$, 100mM NaCl aufgenommen und einige Stunden bei 4°C inkubiert, um ein vollständiges Ablösen der Phagen vom PEG zu erreichen. Die Phagensuspension wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und das Chloroform mit etwas Puffer reextrahiert. Beide wässrigen Phasen

wurden vereinigt und Caesiumchlorid bis zu einer Dichte von 1,5g/ccm (Refraktionsindex 1,3810) darin gelöst. Die Phagenbande wurde nach der Zentrifugation von 18h bei 33 000 rpm und 4°C mit einer Kanüle abgezogen und gegen 0,1M Tris pH 7,9, 0,3M NaCl, 1mM EDTA dialysiert. Danach wurde die Lösung auf 0,05M EDTA gebracht und mit 1/10 Vol. einer 1mg/ml Proteinase K Lösung in 1,5mM CaCl₂ 15Min. bei 37°C verdaut. Nachdem die Lösung auf 0,5% SDS, 0,5% Sarkosyl gebracht worden war, wurde sie weitere 45Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde je einmal mit Phenol und Chloroform ausgeschüttelt und die DNA mit 2 Vol. Ethanol gefällt.

2.3. Isolierung von DNA aus M13-Phagen

Die nach der Transformation von E. coli K12 JM103 mit M13 ssDNA oder dsDNA erhaltenen Plaques wurden mit einer Pasteurpipette ausgestochen und damit frische L-Broth beimpft. Zur Isolierung von dsDNA wurde die Alkali-Methode (siehe B.2.1.2. und B.2.1.3.) benutzt.

Zur Isolierung von einzelsträngiger M13-DNA wurden die Übernachtskulturen abzentrifugiert und der Überstand verwendet. Für die schnelle Analyse mehrerer Plaques wurden 50µl des Überstandes mit 10µl einer Lösung aus 50% Sucrose, 50mM EDTA, 10% SDS und 5mg/ml Bromphenolblau gemischt, direkt auf ein 0,6% Agarosegel aufgetragen und ca. 5h bei 80V einer Elektrophorese unterworfen. Für die Präparation von ssDNA wurde der Überstand auf 0,4M NaCl gebracht und mindestens 30Min. bei Raumtemperatur mit PEG 6000 (40g/l) verrührt. Nach einer Zentrifugation von 1h bei 8000 rpm wurde das Pellet in 10mM Tris (pH 7,4), 0,1mM EDTA aufgenommen. Die Phagen wurden mit Proteinase K (50µg/ml) 30Min. bei 37°C und nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,2%) weitere 30Min. bei 37°C verdaut. Nach dem Ausschütteln mit Phenol und Chloroform wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

2.4. Isolierung von RNA und DNA aus Eukaryontenzellen

Von mehreren getesteten Methoden erwies sich die folgende (nach Chirgwin et al 1979), sowohl im Hinblick auf Qualität der RNA (getestet durch in vitro Translation), als auch auf Zeit- und Materialaufwand als die effektivste.

Die Zellen von Kulturen, die in Suspension wachsen, wurden 10Min. bei 1000 rpm abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, und anschließend sofort lysiert. Monolayerzellen (Zellen, die auf einer festen Oberfläche haftend wachsen) wurden ebenfalls mit PBS gewaschen und direkt in den Flaschen lysiert. Zur Lyse wurde eine Lösung aus 4M Guanidinhochsäure (Fluka), 0,5M Mercaptoethanol, 50mM Na-Acetat pH 5,5, die vorher durch einen Glasfaserfilter filtriert wurde, verwendet. Bis zu 6l der Suspensionszelllinien wurden gleichzeitig verarbeitet, und die Zellen in ca. 40ml Guanidinhochsäure-Lösung lysiert. Die vollständig lysierten Zellen wurden anschließend 45Min. bei 20 000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Zell-Debris zu entfernen.

Die RNA wurde aus dem Zellysat durch Zentrifugation durch ein Caesiumchlorid-Kissen gewonnen. Dazu wurden die Polyallomer-Zentrifugenröhrchen mit 0,5N NaOH ausgekocht und gründlich mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Caesiumchlorid wurde 4h auf 180°C erhitzt und in 10mM Triethanolamin, 1mM EDTA, pH 7,4 zu einer Dichte von 1,8g/ccm (Refraktionsindex 1,4086) gelöst. In die Zentrifugenröhrchen wurde ca. 1,5cm hoch die Caesiumchlorid-Lösung gefüllt und darauf das Zellysat geschichtet. Durch die Zentrifugation von 16h bei 35 000 rpm in einem SW41-Rotor oder 9h bei 51 000 rpm in einem SW60-Rotor, pelletiert die RNA am Boden des Röhrchens. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde die Flüssigkeit bis wenige mm über das Pellet abgesaugt, und das Pellet in 10mM Triethanolamin, 1mM EDTA, pH 7,4 aufgenommen. Die gelöste RNA wurde einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (96/4) ausgeschüttelt und anschließend mit Ethanol gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde sie lyophilisiert und in Wasser aufgenommen.

Zur gleichzeitigen Isolierung von RNA und DNA wurde über das Caesiumchlorid-Kissen der Dichte 1,8g/ccm ein zweites der Dichte

1,5g/ccm geschichtet und darüber das Zellysat. Nach der Zentrifugation bandete die DNA an der Grenzschicht der beiden Caesiumchlorid-Lösungen und konnte mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Sie wurde gegen TE-Puffer dialysiert, mit Phenol und Chloroform ausgeschüttelt und mit Ethanol gefällt.

2.5. Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren

Zur Überprüfung der Reinheit und zur Bestimmung der Konzentration wurde von entsprechenden Verdünnungen der isolierten DNA und RNA in einem Photometer das Absorptionsspektrum von 320nm bis 220nm gemessen. Zur Mengenbestimmung wurde von der Extinktion bei 254nm die bei 320nm abgezogen. Eine O. D. des so gebildeten Wertes wurde einer Konzentration von 50µg/ml dsDNA bzw. 37,5µg/ml ssDNA oder RNA gleichgesetzt.

3. Elektrophorese von Nukleinsäuren

3.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die nach den Angaben des jeweiligen Herstellers mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmente wurden in waagrechten Flachbett-Gelapparaturen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration variierte je nach den benötigten Bedingungen zwischen 0,6% und 1,2%. Zur Analyse von ssDNA wurden niederprozentige Gele benutzt. Zwei Puffersysteme wurden verwendet - Tris-Borat-Puffer: 100mM Tris, 100mM Borat, 2mM EDTA, pH 8,3 und Tris-Acetate-Puffer: 40mM Tris, 20mM Na-Acetate, 2mM EDTA, pH 7,8. Die DNA wurde mit 1/10 Vol. Auftragspuffer (Xylencyanol 5mg/ml, Bromphenolblau 5mg/ml, Sucrose 50%, EDTA 50mM) gemischt und auf die Gele aufgetragen.

Als Molekulargewichtsmarker wurde mit Hind3 geschnittene Lambda-DNA (Sigma) sowie eigene Restriktionsfragmente bekannter Größe verwendet. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid gefärbt, das entweder der noch flüssigen Gellösung zugefügt wurde, oder durch 1 - 3h Inkubation in Ethidiumbromid-haltigem Laufpuffer nach Beendigung der Elektrophorese

in das Gel diffundierte. Die Gele wurden unter UV-Licht ausgewertet und mit einer Polaroidkamera photographiert.

3.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die während der Diplomarbeit verwendeten Agarose-Harnstoff-Gele wurden nicht weiter benutzt, da die RNA aus diesen Gelen nicht auf Nitrocellulose geblottet werden kann. Des weiteren waren die RNA-Banden (ebenso wie bei den getesteten Agarose-Glyoxal-Gelen) nicht so scharf, wie bei den stattdessen verwendeten Agarose-Formaldehyd-Gelen. Es wurden die gleichen waagrechten Flachbettapparaturen wie für die DNA-Gele verwendet. Agarose für eine Endkonzentration von 1,1% wurde in 74% des Gelvolumens Wasser durch Kochen gelöst. Nachdem die Lösung etwa 60°C erreicht hatte, wurde 1/10 des Endvolumens 10x Gelpuffer (200mM Morpholinopropansulfonsäure - MOPS, 50mM Na-Acetat, 1mM EDTA, pH 7,0) und 16 Endvolumenprozent Formaldehyd (37%, Merck, Endkonzentration 2,2M) zugegeben, die Gellösung gemischt und in die vorbereitete Gelform gegossen. Da die heiße Formaldehydlösung die Schleimhäute stark reizt, wurde in einem Abzug gearbeitet.

5 - 10µg RNA wurden in 50% Formamid (mit mixed bed resin AG 501-X8, Bio-Rad, deionisiert), 2,2M Formaldehyd und 1x Gelpuffer 30Min. bei 60°C denaturiert, anschließend mit 1/10 des Volumens Ladepuffer (50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden die ribosomalen RNAs aus den Eukaryontenzellen, sowie rRNA von E. coli (Boehringer) verwendet (28S und 18S rRNA 6333 bzw. 2366 Basen, 23S und 16S rRNA 3566 bzw. 1776 Basen - Rickwood und Hames 1982). Die Proben wurden bei 100 - 110 Volt 5 - 6h aufgetrennt. Die ungefärbten Gele wurden auf DC-Kieselgelfertigplatten 60 F₂₅₄ (Merck) gelegt und mit UV-Licht bestrahlt. Die rRNA-Banden konnten so sichtbar gemacht und ihre Lauflänge bestimmt werden.

4. Blotting von Nukleinsäuren und Hybridisierung

4.1. Blotting von DNA

DNA-Agarose-Gele wurden nach Southern (1975) geblottet (transferiert) - Southern Blots. Die Gele werden erst 30Min. in 1,5M NaCl, 0,5M NaOH denaturiert, anschließend 1h in 3M NaCl, 0,5M Tris (pH 7,0) neutralisiert. Beim Saugblotverfahren wird 20x SSC (3M NaCl, 0,3M Na-Citrat) durch das Gel gesaugt und dadurch die DNA auf die aufliegende Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, BA85) übertragen. Über Filterpapierbrücken wird dabei 20x SSC aus einem Vorratsgefäß auf eine erhöhte Plattform, auf der das Agarosegel liegt, gesaugt. Auf dem Gel liegt die mit Flüssigkeit benetzte Nitrocellulose, darauf wiederum ein Stapel Filterpapier und Papierhandtücher, die sich während des Blotvorgangs vollsaugen.

Beim Trockenblotverfahren wird nur die im Gel befindliche Flüssigkeit durch die aufliegende Nitrocellulose in die Papierhandtücher gesaugt. Es wurde nur verwendet, wenn größere Mengen der gewünschten DNA-Fragmente im Gel waren - z.B. bei klonierten Plasmiden, nicht jedoch beim Blotten von aufgetrennter Zell-DNA. Meistens wurde über Nacht bei Raumtemperatur geblottet. Danach wurde die Nitrocellulose 30Min. in 2x SSC gewaschen, getrocknet und 2h bei 80°C und 0,1 atm gebacken.

4.2. Blotting von RNA

RNA-Formaldehyd-Gele wurden nach Thomas (1980) auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, BA85) geblottet (Northern Blots). Unmittelbar nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gele ungefärbt und unbehandelt einem Saugblotverfahren mit 20x SSC analog dem Southern Blotting unterworfen. Die Nitrocellulose wurde danach ohne weitere Waschungen getrocknet und 2h bei 80°C und 0,1 atm gebacken.

4.3. Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation

Die Nick-Translation wurde mit käuflichen Systemen (NEN, Amersham) durchgeführt. Normalerweise wurden dabei 0,25µg DNA und 60µCi ^{32}P -CTP (Aktivität ca. 3000 Ci/mmol, NEN, Amersham) mit den von den Firmen angegebenen Puffer- und Enzymmengen 2h bei 14°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt, und die freien von den eingebauten Nukleotiden durch Gel-Filtration getrennt. Dazu wurde Bio-Gel A 1,5m Agarose-Gel (Bio-Rad) verwendet. Das Bio-Gel wurde mit TE-NaCl-Puffer (10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA, 100mM NaCl) gewaschen und in eine silikonisierte Pasteurpipette gefüllt, die mit etwas Glaswolle gestopft war. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und die Säule mit TE-NaCl-Puffer eluiert. Mit einem Geigerzähler wurden die Fraktionen, die die markierte Nukleinsäure enthielten, identifiziert und Aliquots davon mit Aquasol (NEN) im Szintillationscounter gezählt. Es wurden regelmäßig spezifische Aktivitäten von etwa 2×10^8 cpm/µg DNA erreicht.

4.4. Hybridisierung von Southern Blots

Die gebackenen, kurz mit 6x SSC (0,9M NaCl, 0,09M Na-Citrat) befeuchteten Nitrocellulose-Filter wurden mit ca. 0,2ml Prähybridisierungs-Lösung pro cm^2 in einer Plastikfolie eingeschweißt. Die Prähybridisierungslösung bestand aus 6x SSC, 0,5% SDS, 5x Denhardts-Lösung (1mg Ficoll 400, 1mg Polyvinylpyrrolidon, 1mg Rinder-Serumalbumin pro ml) und 100µg/ml Kalbsthymus-DNA, die vorher 10Min. auf 100°C erhitzt und anschließend rasch abgekühlt worden war. Nach einer Inkubation von ca. 4h bei 68°C wurde der Plastikbeutel an einer Ecke aufgeschnitten und etwa 2/3 der Prähybridisierungslösung entnommen. Die radioaktive DNA wurde 10Min. auf 100°C erhitzt, rasch abgekühlt und in den Beutel pipettiert, der daraufhin wieder zugeschweißt wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht ebenfalls bei 68°C. Danach wurde die Nitrocellulose zweimal 5Min. in 2x SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal 1h in 0,1x SSC, 0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Anschließend wurde sie getrocknet und in einer Kassette mit

Verstärkerfolie (DuPont) mit Röntgenfilm (Kodak X-Omat S) bei -70°C exponiert.

4.5. Hybridisierung von Northern Blots

Die Blots wurden ebenfalls mit ca. 0,2ml Prähybridisierungslösung pro cm^2 in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Prähybridisierungslösung bestand aus 6x SSC, 50mM Na-Phosphat pH 6,5, 50% Formamid (mit mixed bed resin deionisiert), 5x Denhardts-Lösung und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierter Kalbsthymus-DNA. Die Nitrocellulose-Filter wurden 4h bei 50°C prähybridisiert. Anschließend wurde ebenfalls etwa 2/3 der Prähybridisierungslösung entnommen, und die denaturierte radioaktive Probe hinzupipettiert. Hybridisiert wurde über Nacht bei 50°C . Das Waschen und Exponieren erfolgte wie bei Southern Blots.

5. Hybrid Selection

Zur Isolierung spezifischer mRNAs wurde die für diese kodierende DNA auf Nitrocellulose getropft und eine Gesamt-RNA-Population dagegen hybridisiert. Anschließend wurde nicht hybridisierende RNA gewegewaschen, und die gebundene mRNA vom Filter eluiert.

Je 8 μg durch Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation gereinigte Plasmid-DNA wurde in einem Wasserbad dreimal 60 Sek. beschallt, sodaß DNA-Fragmente von etwa 1000bp entstanden. Danach wurde die DNA 10Min. auf 100°C erhitzt und schnell abgekühlt. Aus Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, BA85) wurden ca. 5x5mm große Stücke geschnitten, die denaturierte DNA aufgetropft und die Filter bei 4°C getrocknet. Danach wurden die Filter in 6x SSC gewaschen, erneut getrocknet und 2h bei 80°C und 0,1 atm gebacken. Vor der Hybridisierung wurde der Prozeß des Eluierens durchgeführt, um dabei sich ablösende DNA abzutrennen. Dazu wurden die Filter zweimal in je 300 μl Wasser 90Sek. auf 100°C erhitzt, anschließend rasch abgekühlt und das Wasser verworfen.

Die Hybridisierung fand statt in 65% Formamid (deionisiert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt), 0,4M NaCl und 10 - 20 mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure (Pipes, Sigma) pH 7,0. Zwei Filter

wurden mit meist 100µg RNA in 80 - 100µl Volumen 2,5h bei 52°C hybridisiert. Bei der Verwendung von sehr kurzen DNA-Fragmenten (M13-Klone zur Feinkartierung einzelner Leserahmen) wurde 3h bei 45°C hybridisiert. Danach wurden die Filter acht- bis zehnmal mit 1ml 1x SSC, 0,5% SDS bei 62°C bzw. 55°C und dreimal mit 2mM EDTA bei Raumtemperatur gewaschen. Die gebundene mRNA wurde eluiert, indem die Filter 75Sek. in 300µl Wasser gekocht und anschließend in flüssigem Stickstoff oder Methanol/Trockeneis abgekühlt wurden, ohne sie jedoch einzufrieren. Die eluierte mRNA wurde entnommen und mit 20µg Kalbsleber-tRNA (Boehringer) Ethanol gefällt. Die mRNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, in einer Speed-Vac lyophilisiert und in wenigen µl Wasser aufgenommen.

Die Nitrocellulose-Filter wurden nochmals zweimal mit 300µl Wasser 90 Sek. gekocht, schnell abgekühlt und das Wasser verworfen. Sie konnten danach erneut für Hybridisierungen verwendet werden. Einzelne Filter wurden bis zu zehnmal verwendet, wobei allerdings eine leichte Reduktion der mRNA-Ausbeute zu verzeichnen war.

Die Menge der auf die Nitrocellulose getropften DNA und der zur Hybridisierung verwendeten RNA, Hybridisierungstemperatur und Hybridisierungszeit, sowie die Dauer des Erhitzens der Filter zum Eluieren der mRNA wurden durch Versuche optimiert. Durch einen Kontrollversuch wurde überprüft, daß durch obige Methode tatsächlich alle hybridisierten mRNAs von den Filtern entfernt werden konnten.

6. In vitro Translation

6.1. Herstellung eines Kaninchen-Retikulozytenlysats

Das Kaninchen-Retikulozytenlysate wurde nach Szöts und Meo (persönliche Mitteilung) präpariert. Zwei bis drei kg schwere Kaninchen wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen je 1,7ml 1,25% Acetylphenylhydrazin (Sigma) subkutan injiziert, um sie anämisch zu machen. Am 4.Tag darauf wurden die Tiere betäubt und durch Herzpunktion entblutet. Die Injektionen sowie das Entbluten der Kaninchen wurden freundlicherweise von Frau Dr.R.Scheid durchgeführt. Durch eine Retikulozytenfärbung wurde vorher

der Anteil der Retikulozyten im Blut bestimmt, um sicherzustellen, daß die Präparation erfolgversprechend ist. Dabei wurden die Zellen mit Brillantkresolblau angefärbt, und das Verhältnis Retikulozyten zu Erythrozyten unter dem Mikroskop bestimmt.

Nach dem Entbluten wurde das Blut sofort mit demselben Volumen kalter Saline-Lösung (0,14M NaCl, 1,5mM Mg-Acetat, 5mM KCl) und etwas Heparin gemischt und 10Min. bei 2000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden insgesamt fünfmal mit Saline-Lösung gewaschen und jeweils 10Min. bei 2000 g abzentrifugiert. Die Leukozyten, die sich auf dem Pellet ansammelten, wurden dabei jeweils abgesaugt und verworfen. Schließlich wurde das gleiche Volumen an deionisiertem Wasser zu den Zellen gegeben und die Zellen lysiert. Das Lysat wurde 15Min. bei 30 000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in 1ml Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der Verdau des Lysats mit der Ca^{2+} -abhängigen Micrococcus Nuklease (nach Pelham und Jackson 1976) erfolgte in den 1ml Fraktionen. Hämin (Sigma) wurde in 85% Ethylenglykol, 10mM Tris pH 7,5 gelöst und dem auftauenden Retikulozytenlysat mit einer Endkonzentration von 25µM zugesetzt, um die Aktivierung des Hämin-kontrollierten Inhibitors der Proteinsynthese zu unterbinden (Datta et al 1978). Die optimale Menge der Häminkonzentration wurde durch einen Versuch bestimmt. Anschließend wurde das Lysat auf 1mM CaCl_2 gebracht und eine Einheit der Micrococcus Nuklease (Sigma, 120 Einheiten/ml in 50mM Glycin pH 9,2, 5mM CaCl_2) zugegeben. Der Verdau der endogenen mRNA erfolgte 15Min. bei 20°C. Danach wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von EGTA (2mM Endkonzentration). Das Lysat wurde auf 0,16mg/ml Kreatinkinase (Sigma, Stammlösung 40mg/ml in 50% Glycerin, entspricht ca. 6000 Einheiten/ml) gebracht, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Nukleaseverdau wurde durch Kontrolltranslationen mit und ohne RNA-Zugabe überprüft.

Um vom endogenen Gehalt des Lysats an den einzelnen Aminosäuren unabhängig zu sein, wurden alle 20 Aminosäuren gelöst und verschiedene Pools (Mischungen) hergestellt, in denen diejenigen, die als radioaktiv markierte Aminosäure verwendet wurden, jeweils fehlten. Alle anderen waren im Pool mit einer Konzentration von je 2,5mM gelöst. Cystein

wurde nicht dem Aminosäure-Pool, sondern dem Master-Mix zugegeben, um es durch die DTT-Konzentration dort reduziert zu halten. Der Master-Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

Hepes pH 7,5	800mM
Kreatinphosphat (Boehringer)	400mM
ATP (Boehringer)	40mM
GTP (Boehringer)	2mM
DTT (Sigma)	40mM
Spermidin (Sigma)	20mM
Cystein	2mM.

6.2. In vitro Translation

Die RNA wurde unmittelbar vor dem Start der in vitro Translation 90Sek. auf 70°C erhitzt und anschließend im Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen zu lösen, durch die vor allem die Synthese langer Polypeptide behindert wird.

Ein Standard-Translationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

60%	Retikulozytenlysat
2%	Aminosäure-Pool
2,5%	Master-Mix
300µg/ml	Gesamt-RNA
64mM	Kaliumzugabe als K-Acetat
0,8mM	Magnesiumzugabe als Mg-Acetat
1-1,5 mCi/ml	³⁵ S-Methionin
2-3µg	Kalbsleber-tRNA

Die Abhängigkeit der in vitro Translation von den einzelnen Parametern wurde bereits in der Diplomarbeit untersucht. Die optimale Menge der zuzusetzenden Kalium- und Magnesiumionen wurde für jede Lysatpräparation austitriert. Die Zugabe von Kalbsleber-tRNA erhöhte den Einbau von Radioaktivität erheblich. Als radioaktive Aminosäure wurde üblicherweise ³⁵S-Methionin (NEN, Amersham) mit einer Aktivität von über 800 Ci/mmol verwendet. In einzelnen Versuchen wurde jedoch auch ³⁵S-Cystein (NEN, über 600 Ci/mmol) sowie eine Mischung ³H-markierter Aminosäuren (Amersham, alle Aminosäuren außer

Methionin, Asparagin, Glutamin, Cystein und Tryptophan, durchschnittlich 30 - 40 Ci/mmol spezifische Aktivität) eingesetzt, um eventuell mit Methionin nicht oder schlecht markierbare Proteine zu identifizieren. Außer leichten Variationen in der Intensität einzelner Banden konnte jedoch kein Unterschied entdeckt werden.

Die Translationsansätze wurden 2h bei 30°C inkubiert und dann durch Zugabe von Immunpräzipitations-Puffer oder Auftragspuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gestoppt.

Um den radioaktiven Einbau in Abhängigkeit von den einzelnen Parametern zu testen, wurden die Translationsansätze einmal durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert, zum anderen durch TCA-Fällung quantitativ ausgewertet. Dabei wurde zum Zeitpunkt 0Min., 30Min., 60Min., 90Min. und 120Min. der Translation je 1µl entnommen und auf einen Filterpapierstreifen getropft. Das Filterpapier wurde mindestens 30Min. in 5% TCA-Lösung gelegt, anschließend 5Min. in 5% TCA-Lösung gekocht, zweimal mit 5% TCA-Lösung und zweimal mit Ethanol gewaschen, getrocknet und mit Aquasol (NEN) in einem Szintillationscounter gezählt.

Um Proteine zu identifizieren, die sich mit Kaninchen-Retikulozytenlysat nicht oder schlecht translatieren lassen, wurden RNAs aus allen verwendeten Zelllinien mit Micrococcus Nuklease verdautem Weizenkeimlysat (BRL) in vitro translatiert. Die optimale RNA-Konzentration sowie die zuzusetzenden Ionenmengen wurden wiederum ausgetestet. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Translationen mit Retikulozytenlysat.

7. Klonieren von DNA-Fragmenten

7.1. Material

Ausgangsmaterial für die erfolgten Klonierungen waren bereits vorhandene EBV-DNA-Klone (Skare und Strominger 1980, Polack et al 1984b). Fragmente aus diesen Klonen wurden in pUC-Vektoren und M13-Phagen kloniert, um spezifische DNA-Stücke zur Hybridisierung zu erhalten. Mit Hilfe des Rechners des Max von Pettenkofer-Instituts (VAX

750) wurden mit mehreren Programmen (Devereux et al 1984, Staden 1984a, Staden 1984b) aus der vollständigen EBV-DNA-Sequenz (Baer et al 1984) die gewünschten Daten (kurze DNA-Sequenzen, Restriktionsschnittstellen, offene Leserahmen, sowie Größe der Restriktionsfragmente) abgerufen, und so die am besten zur Klonierung geeigneten Restriktionsschnittstellen identifiziert.

Die pUC-Vektoren besitzen eine Cloning-Site (Klonierungsstelle) mit Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme in einem 433bp langen Fragment des *E. coli* lac Z Gens, vor dem lac-Promotor und lac-Operator liegen. Werden die *E. coli* Stämme JMB3 oder JM103, die einen Defekt im lac Z Gen aufweisen, mit diesen Plasmiden transformiert, so kann die lac Z Aktivität komplementiert werden. Als Nachweis dieser Aktivität und damit der Aufnahme des Plasmids dient der hydrolytische Abbau von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indigo, einem Farbstoff, der die Bakterienkolonien blau färbt. Wird fremde DNA in die Cloning-Site inseriert, kann die lac Z Funktion nicht mehr komplementiert werden, die Bakterien können keinen Farbstoff produzieren und bilden weiße Kolonien. Auf diese Weise können nach einer Transformation Bakterien mit Plasmiden mit Insertion von Bakterien mit Plasmiden ohne Insertion unterschieden werden. Falsch negative Ergebnisse kann dieser Test zeigen, wenn kurze DNA-Stücke inseriert werden, die den Leseraster des lac Z Fragments nicht verschieben.

Agarplatten, auf die Transformationsansätze mit den pUC-Vektoren ausplattiert wurden, enthielten 40 μ g/ml X-Gal (Biomol, Stammlösung 20mg/ml in Dimethylformamid). Im Stamm JMB3 reicht die normal vorhandene Menge an lac-Repressor nicht aus, alle lac-Operatoren auf den Plasmiden zu besetzen, darum wird der darauf befindliche lac Z Anteil exprimiert und Komplementation kann stattfinden. Im Gegensatz dazu ist der Stamm JM103 ein Überproduzierer des lac-Repressors, so daß zur Expression und damit zur Komplementation die Induktion mit Isopropylthiogalaktosid (IPTG, 0,3mM) nötig ist.

Die M13-Phagen enthalten ebenfalls die entsprechenden multiplen Cloning-Sites der pUC-Plasmide in dem lac Z Fragment. Zur Vermehrung der Phagen dient der F-Episomhaltige Stamm JM103. Bei der Zugabe von

X-Gal und IPTG zum Weichagar erhält man in entsprechender Weise blaue Plaques mit Phagen ohne Insertion und weiße Plaques mit Phagen mit Insertion.

7.2. Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmente

Die zur Klonierung verwendeten EBV-DNA-Klone wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und auf Agarosegelen ohne Ethidiumbromid aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 10 - 40µg DNA, abhängig von der Zahl und der Größe der zu erwartenden Banden, in mehreren nebeneinanderliegenden Slots elektrophoretisiert. Danach wurden die Gele kurz in Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht ausgewertet und photographiert. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Ebenso wurden die Vektoren nach dem Verdau auf einem Agarose-Gel elektrophoretisiert, um ungeschnittene Plasmide zu entfernen, die später bei der Transformation erheblichen Background verursachen würden. Die Agarose-Stückchen mit den Banden wurden mit etwas Elektrophorese-Puffer in Dialyseschläuche gesteckt und sodann in den Elektrophoreseapparaturen in die gleiche Richtung, in die sie auch vorher gelaufen waren, bei 110 Volt etwa 4h weiter elektrophoretisiert. Mit einer UV-Lampe wurde überprüft, ob die DNA das Agarose-Stückchen vollständig verlassen hat. Danach wurde dieses entfernt und der Puffer aus dem Dialyseschlauch entnommen. Der Schlauch wurde nochmals mit Puffer gespült und beide Fraktionen vereinigt.

Die DNA wurde anschließend mit einer Elutip-d-Säule (Schleicher und Schüll) gereinigt und konzentriert. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde die Säule erst mit 2ml Hochsalzpuffer (1M NaCl, 20mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,4) und anschließend mit 5ml Niedersalzpuffer (0,2M NaCl, 20mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,4) gewaschen, wobei die Lösungen wie auch alle weiteren mit einer Spritze, die auf die Säule aufgesteckt wurde, unter Druck durch die Säule gepreßt wurden. Danach wurde die eluierte DNA durch einen 0,45µm Celluloseacetat-Filter (Schleicher und Schüll) und durch die Säule gedrückt, wobei die DNA an die Säulenmatrix bindet. Anschließend wurde mit 3ml Niedersalzpuffer gewaschen und die DNA wieder eluiert, indem 0,4ml Hochsalzpuffer durch die Säule gepreßt

wurden. Die gereinigte DNA wurde mehrmals mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt, um das Ethidiumbromid zu entfernen, Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 10 - 20µl TE-Puffer aufgenommen. 5 - 10% des Volumens wurde auf sogenannte Minigele, niederprozentige Ethidiumbromid-haltige Agarose-Gele, die mit hoher Stromstärke gefahren wurden, aufgetragen. Bereits nach etwa 60Min. konnten die Gele ausgewertet, und die Reinheit der DNA sowie die Konzentration abgeschätzt werden.

7.3. Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach Hanahan (1983). Mit einer Übernachtskultur wurden 50ml Medium angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C geschüttelt, bis sie eine Zelldichte von $4 - 7 \times 10^7$ /ml (dies entspricht einer optischen Dichte von 0,44 - 0,55 bei 550nm) erreicht hatten. Darauf wurden sie 10Min. auf Eis abgekühlt und 12Min. bei 4°C in einem A6.9 Rotor bei 2500 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 17ml FSB-Puffer (10mM K-Acetat, 100mM KCl, 45mM $MnCl_2$, 10mM $CaCl_2$, 3mM Hexamminkobalttrichlorid - Fluka, 10% Glycerin, pH 6,4) aufgenommen und 15Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien in einem A8.24 Rotor bei 3000 rpm und 4°C 10Min. erneut abzentrifugiert und in 4ml FSB-Puffer aufgenommen. Nach 5Min. Inkubation auf Eis wurden 140µl Dimethylsulfoxid (DMSO) dazugemischt und die Bakterien weitere 5Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden erneut 140µl DMSO zugegeben und wiederum 5Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Aliquots zu je 210µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

7.4. Ligierung und Transformation

Etwa 0,2µg des eluierten Vektors wurden etwa mit der dreifachen Molmenge des zu inserierenden DNA-Stückes gemischt, 5Min. auf 65°C erwärmt und anschließend schnell abgekühlt. Mit 1 - 2 Einheiten

T4-DNA-Ligase (Boehringer) wurden die Fragmente dann in 50mM Tris, 10mM DTT, 500µg/ml Rinderserumalbumin, pH 7,6 über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Transformation erfolgte ebenfalls nach Hanahan (1983). Die kompetenten Bakterien wurden aufgetaut und 10Min. bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe der ligierten DNA (20 - 50% des Ligierungsansatzes pro 210µl Bakterien) wurden sie weitere 30Min. auf Eis inkubiert. Darauf wurden sie ohne zu schütteln 90Sek. auf 42°C erwärmt. Bei der Klonierung in Plasmiden wurde danach 800µl Medium ohne Antibiotikum zugegeben und 1h bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf L-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Bei der Klonierung in M13-Phagen wurde zu jedem Transformationsansatz 10µl 100mM IPTG, 50µl 2% X-Gal, 200µl Übernachtskultur E. coli JM103 und 3ml Soft-Agar gegeben, kurz gemischt, auf Platten mit L-Agar ohne Antibiotikum gegossen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Die von P.Farrell und B.Barrell als einzelsträngige DNA erhaltenen M13-Klone wurden nach der gleichen Methode in JM103 transformiert.

7.5. Screening der erhaltenen Rekombinanten

Nach Transformationen mit Plasmiden wurde eine Reihe von Kolonien auf 5ml-Kulturen überimpft (im Falle der pUC-Plasmide wurden natürlich nur weiße Kolonien gepickt) und über Nacht bei 37°C bebrütet. Mit der Alkali-Methode wurde die DNA isoliert (siehe B.2.1.3.), durch Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen und anschließender Gelelektrophorese charakterisiert und die Spaltmuster mit den nach den Restriktionskarten zu erwartenden Bandenmustern verglichen.

Die mit M13-Phagen erhaltenen rekombinanten Plaques wurden mit Pasteur-Pipetten ausgestochen und ebenfalls 5ml-Kulturen damit beimpft. Nachdem sie über Nacht bei 37°C inkubiert worden waren, wurden die Kulturen abzentrifugiert und aus dem Bakterienpellet die dsDNA (Replikative Form) mit der Alkali-Methode (siehe B.2.1.3.) isoliert und wie bei Plasmiden charakterisiert. Der Überstand der Kulturen wurde auf Agarose-Gele aufgetragen (siehe B.2.3.) und die einzelsträngige DNA aus den Phagenpartikeln analysiert.

Von Rekombinanten, die zur Expression von Proteinen in Bakterien kloniert wurden, wurde jeweils direkt die Expression getestet.

8. Expression von eukaryontischen Proteinen in Bakterien

8.1. Expressionsvektoren

Eukaryontische Proteine, die in *E. coli* ohne oder nur mit einer kurzen, anhängenden Prokaryonten-Aminosäuresequenz synthetisiert werden, sind meist instabil. Sie werden von bakteriellen Proteasen wieder abgebaut, oder sind für die Bakterien toxisch bzw. behindern ihr Wachstum (Motz, Bröker, persönliche Mitteilungen). Daher wurden die gewünschten Proteine als Fusionsproteine mit der *E. coli* β -Galaktosidase exprimiert. Als Vektoren dienten die pUR-Plasmide (Rüther und Müller-Hill 1983), die neben einer Ampicillin-Resistenz das lac-Operon mit dem lac Z Gen besitzen. Am 3'-Ende des lac Z Gens ist eine Cloning-Site mit Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme inseriert, in die das zu exprimierende DNA-Fragment kloniert wird. In den einzelnen pUR-Plasmiden ist die Cloning-Site bezüglich des lac Z Gens in allen möglichen Leserastern inseriert, so daß nach Wahl des richtigen Vektors ein durchgehender offener Leserahmen vom lac Z Gen in das zu exprimierende Gen existiert und die eukaryontische Aminosäuresequenz am Carboxyl-Ende der β -Galaktosidase angefügt wird. In allen Konstrukten zur Expression wurde das Ende des offenen Eukaryonten-Leserahmens mit inseriert, so daß die Fusionsproteine mit dem Carboxyl-Ende des EBV-Proteins enden.

Durch Transformation der Plasmide in *E. coli* JM103, die den lac-Repressor konstitutiv in großen Mengen produzieren (siehe B.7.1.), kann die Produktion des Fusionsproteins durch Induktion mit IPTG gestartet werden. Nachdem die Bakterien eine ausreichende Zellzahl erreicht haben, wird durch die Induktion die massive Produktion des Fusionsproteins angeschaltet. Da die Bakterien bereits die gewünschte Zahl erreicht haben und kurz nach der Induktion lysiert werden, bleiben negative Auswirkungen auf das Wachstum ohne Auswirkungen.

Es wurde auch versucht, eines der eukaryontischen Proteine in einem

pUC-Vektor zu exprimieren. Dabei wurde der offene Leserahmen so in den Vektor inseriert, daß unter Kontrolle des lac-Operons die ersten 8 Aminosäuren der β -Galaktosidase exprimiert werden und daran anschließend die Aminosäurekette des EBV-Proteins. Da der offene Leserahmen in der inserierten DNA endet, würden die Bakterien ein fast reines Eukaryontenprotein mit nur 8 fremden Aminosäuren produzieren. Jedoch wie vermutet, ist weder im Coomassie gefärbten Gel, noch im Western Blot eine Proteinbande sichtbar - das Protein ist nicht stabil.

8.2. Klonierung von EBV-Sequenzen in Expressionsvektoren

Die zu exprimierenden Leserahmen wurden, wie in Kapitel B.7. beschrieben, mit dem Computer analysiert und mit geeigneten Restriktionsenzymen in die pUR-Vektoren kloniert. Dabei wurde jeweils eine Schnittstelle in der ersten Hälfte des offenen Leserahmens und eine 3' nach dem offenen Leserahmen gewählt, so daß mehr als 50% der Proteinsequenz an die β -Galaktosidase fusioniert wurde und das Carboxyl-Ende des EBV-Proteins auch das Ende des Fusionsproteins war. Die Schnittstelle im Leserahmen wurde so gewählt, daß mögliche antigene Stellen des Proteins exprimiert wurden. Mit einem Computerprogramm, das in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde und auf einem Programm von E.Golub aufbaut (Cohen G.H. et al 1984), wurde mit der VAX 750 die mögliche Sekundärstruktur nach Chou und Fasman (1974a, 1974b) berechnet und durch die Werte für die Hydrophilizität (Hopp und Woods 1981) des Proteins überlagert. Es wurde davon ausgegangen, daß sich die antigenen Stellen eines Proteins auf der Oberfläche befinden. Sogenannte β -Turns, Regionen, in denen Strukturen wie α -Helix oder β -Faltblatt abgebrochen werden, die zusätzlich hydrophil sind, stellen wohl bevorzugt nach außen gerichtete loop-artige Strukturen und somit antigenen Stellen dar. Bei mehreren Proteinen stimmen die Vorhersagen des Computers mit den tatsächlichen antigenen Stellen überein (Cohen G.H. et al 1984, Dietzschold et al 1984, Motz und Wolf, Jameson, persönliche Mitteilungen).

8.3. Produktion und Reinigung der exprimierten Proteine

Zur Produktion der Expressionsproteine wurde Ampicillin haltiges Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bebrütet, bis die Bakterien eine optische Dichte von etwa 0,9 erreicht hatten. Daraufhin wurde das Medium auf 1mM IPTG gebracht und die Bakterien weitere 2 - 4h bei 37°C inkubiert. Bei der Reinigung der Proteine zur Immunisierung der Kaninchen wurde das Medium zusätzlich auf 1mM Zinksulfat gebracht, da Zinkionen bakterielle Proteasen hemmen (Gross persönliche Mitteilung). Als Test, ob und in welchem Umfang die exprimierten Proteine produziert werden, wurden 1,5ml der Bakteriensuspension in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und in 300µl Auftragspuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgenommen. 10 - 20µl davon wurden direkt in SDS-Polyacrylamid-Gelen analysiert.

Bei der Reinigung der Proteine wurde 1l Bakteriensuspension 10Min. bei 5000 rpm abzentrifugiert und in 50ml PBS mit 50mM EDTA und 1mg/ml Lysozym suspendiert. Nach 2h Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien 10Min. mit einem Labsonic 1510 Ultraschallgerät bei 400W beschallt. Das Lysat wurde auf 3% Triton X100 (Serva) gebracht und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Darauf wurde es 30Min. bei 17 000 rpm und 20°C in einem A8.24 Rotor zentrifugiert, worauf sich nahezu alle Bakterienproteine im Überstand befanden, die große Masse des exprimierten Fusionsproteins jedoch noch im Pellet. Das Pellet wurde in 8M Harnstoff, 20mM Tris pH 8,0, 0,5% Mercaptoethanol suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde erneut 30Min. bei 17 000 rpm und 20°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem der Großteil des Fusionsproteins gelöst war, wurde nacheinander gegen 6M, 4M und 3M Harnstoff - jeweils mit 20mM Tris pH 8,0 - dialysiert. Darauf wurde wiederum 30Min. bei 17 000 rpm und 20°C zentrifugiert, wobei weitere bakterielle Proteine abgetrennt wurden. Der Überstand, in dem sich immer noch der Großteil des Fusionsproteins befand, wurde darauf bei 4°C gegen PBS dialysiert. Nun fiel die Masse des Fusionsproteins aus und konnte durch Zentrifugation (30Min., 17 000rpm, 4°C) gewonnen werden.

8.4. Immunisierung der Kaninchen

Die Kaninchen wurden etwa alle zwei Wochen mit einer Proteinpräparation aus ca. 250ml Bakterienkultur immunisiert. Für die erste Injektion wurde die Proteinsuspension 1:1 mit komplettem Freud'schem Adjuvans gemischt, für die weiteren Injektionen mit inkomplettem. Nach 6 Wochen wurde das Serum erstmals durch Immunpräzipitation getestet, wobei alle Kaninchen bereits positiv waren. Die Injektionen sowie die Blutentnahme wurden freundlicherweise von Dr.W.Jilg durchgeführt.

9. Zellkultur

Alle Zellen wurden in RPMI 1640 (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum, das 30Min. bei 56°C inaktiviert worden war, 200 IE/ml Penicillin, 200µg/ml Streptomycin und 7,5µg/ml Glutamin gezogen. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen meist alle 3 - 5 Tage 1:1 gesplittet.

Um die Produktion viraler mRNAs und Proteine zu steigern, wurden die Zellen mit 40ng/ml Phorbol ester (TPA) in Dimethylsulfoxid und 3mM Buttersäure induziert. 2 Tage nach der Induktion wurden die Zellen entweder zur RNA-Präparation lysiert, oder in vivo markiert. Unmarkierte Proteinextrakte wurden 3 Tage nach der Induktion präpariert.

9.1. In vivo Markierung von Proteinen

Zur in vivo Proteinmarkierung wurden pro Slot in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 1×10^6 Zellen abzentrifugiert (800 rpm, 10Min.), in PBS gewaschen und etwa dem Viertel des ursprünglichen Volumens Markierungsmedium aufgenommen. Das Markierungsmedium bestand aus MEM (Minimal Essential Medium, Gibco) ohne Methionin, 5% fötalem Kälberserum und 20 µCi/ml ^{35}S -Methionin (über 800 Ci/mmol, Amersham, NEN). Falls die Zellen induziert waren, wurden 40ng/ml Phorbol ester zugesetzt. Die Markierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einem CO_2 -Inkubator. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in

Immunpräzipitationspuffer lysiert.

Zur in vivo Markierung der immediate early Proteine in induzierten Raji-Zellen wurden die Zellen gleichzeitig mit der Induktion mit 50µg/ml Cycloheximid gehemmt und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie mit Cycloheximid-freiem Medium, das 2µg/ml Actinomycin D enthielt, gewaschen und 1 - 2 Stunden mit Actinomycin D haltigem (2µg/ml) Markierungsmedium (100µCi/ml ³⁵S-Methionin) markiert.

9.2. Superinfektion

Zur Superinfektion wurde Virus aus P3HR1-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit Phorbol ester und Buttersäure induziert und nach einer Woche Inkubation bei 37°C 20Min. bei 4000 rpm in einem A6.9 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abzentrifugiert - 2h bei 13000 rpm und 4°C in einem A6.14 Rotor. Das so erhaltene Viruspellet wurde in etwas Medium suspendiert, 2h auf Eis inkubiert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Geometrische Verdünnungen jeder Präparation wurden jeweils durch Superinfektionen getestet, um die benötigte Mindestmenge an Virus zur VCA-Induktion zu bestimmen.

Dabei wurden wie bei der Markierung früher und später Proteine in superinfizierten Raji-Zellen 8h nach dem Splitten pro Immunpräzipitation 1×10^6 Zellen abzentrifugiert. Die entsprechende Menge an Virussuspension wurde zugegeben und 1h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Danach wurde etwas RPMI 1640 mit 2% fötalem Kälberserum zugegeben und die Zellen 12h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in Methionin-freiem MEM mit 2% fötalem Kälberserum und 50 µCi/ml ³⁵S-Methionin aufgenommen und 4h bei 37°C inkubiert. Darauf wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und in Immunpräzipitationspuffer lysiert.

Zur Markierung der immediate early Proteine in superinfizierten Raji-Zellen wurden die Zellen nach der Virus-Adsorption 4h in Medium mit 50µg/ml Cycloheximid inkubiert, anschließend mit Medium, das 2µg/ml Actinomycin D enthielt, gewaschen und wie oben beschrieben in

Markierungsmedium mit Actinomycin D für 1 - 2h markiert und weiter verarbeitet.

10. Immunfluoreszenz

Mit Phorbol ester induzierte Zellen wurden 2 Tage nach der Induktion dreimal mit PBS gewaschen, auf Objektträger aufgetragen und kurz getrocknet. Darauf wurden die Zellen 10Min. in Aceton bei -20°C fixiert, wiederum kurz getrocknet und bei -20°C aufbewahrt. Alternative Fixierungsmittel waren Petrolbenzin, Methanol und Aceton/Methanol (1:1).

Da die verwendeten Seren starke unspezifische Fluoreszenz zeigten, wurden die Immunglobuline durch Ammonsulfat-Fällung angereichert. Dazu wurde das Serum mit dem halben Volumen einer gesättigten, gepufferten Ammonsulfat-Lösung 2h bei Raumtemperatur gemischt. Die ausgefallenen Immunglobuline wurden durch Zentrifugation (10Min. bei 10 000 rpm in einem A8.24 Rotor) isoliert und in etwa der Hälfte des ursprünglichen Volumens PBS aufgenommen. Die Lösung wurde erneut mit dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfat-Lösung gemischt und die Antikörper ein zweites Mal gefällt, abzentrifugiert und in PBS aufgenommen. Das Ammonsulfat wurde durch eine Sephadex G50 Säule abgetrennt. Die Säule wurde mit PBS eluiert und entsprechende Verdünnungen der Fraktionen im Photometer gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Extinktion bei 280nm wurden verwendet.

Die Antikörper wurden auf die einzelnen Felder der fixierten Objektträger aufgetropft und 2h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Objektträger zweimal 5Min. mit PBS gewaschen, FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (Dako) aufgetropft und 1h bei 37°C inkubiert. Darauf wurden die Objektträger wiederum zweimal 5Min. mit PBS gewaschen und mit Glycerin eingedeckt.

11. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation in vivo markierter Proteine wurden die Zellen in Immunpräzipitationspuffer lysiert; im Falle der in vitro Translationen wurden die Translationsansätze mit dem zehnfachen Volumen an Puffer versetzt. Bei der Verwendung von Kaninchen- oder Patientenseren wurde A_{SDS}-Puffer (Bayliss et al 1983) benutzt: 1% Triton X100, 0,1% SDS, 0,137% NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10% Glycerin, 20mM Tris pH 9,0, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma). Für Monoklonale Antikörper wurde 0,5% Nonidet P40, 20mM Tris pH 9,0, 0,3M NaCl, 1mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, 10% Glycerin, 1mM PMSF (Pearson et al 1983) als Puffer verwendet. Für eine Immunpräzipitation wurden 5 - 10µl des Serums etwa 5h bei Raumtemperatur mit den markierten Proteinen gemischt. Darauf wurden 3mg in Puffer gequollene Protein A-Sepharose CL4B Beads (Pharmacia) zugegeben. Nach etwa 2h Mischen bei Raumtemperatur, wobei die Immunglobuline an das Protein A binden, wurden die Sepharose Beads kurz abzentrifugiert und dreimal mit Immunpräzipitationspuffer sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Die Beads wurden in etwas Auftragspuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgenommen und darin 5Min. auf 100°C erhitzt.

Um Antikörper gegen zelluläre Proteine mit unmarkierten Proteinen abzusättigen, wurde das Serum in den meisten Fällen unmittelbar vor Gebrauch mit einem Proteinextrakt aus unmarkierten EBV-negativen BJA-Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dazu in PBS gewaschen und in Immunpräzipitationspuffer lysiert. Pro Immunpräzipitation wurde das Serum mit dem Extrakt aus etwa 10⁷ Zellen präinkubiert. Ähnlich kann die Immunpräzipitation viraler Proteine durch Präinkubation mit einem EBV-Proteine enthaltenden unmarkiertem Proteinextrakt gehemmt werden (Bayliss et al 1983). Diese (auch die immediate early Proteine enthaltenden) wurden analog zu den markierten Protein-Extrakten, lediglich ohne radioaktive Aminosäure hergestellt.

12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden nach Lämli (1970) in einem diskontinuierlichen Puffersystem aufgetrennt. Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 2% SDS, 5% Mercaptoethanol und 3% Sucrose in 50mM Tris pH 7,0 mit etwas Bromphenolblau gebracht und 5Min. auf 100°C erhitzt. Die Trenngele bestanden aus 7,5 - 17% Acrylamid (Bio-Rad, je nach der Größe der gesuchten Proteine), 0,026% Diallyltartardiamin (DATD, Bio-Rad) pro Prozentanteil Acrylamid, 0,15% SDS, 0,375M Tris pH 8,5. Die Polymerisation wurde durch Zugaben von 0,14mM Ammoniumperoxidisulphat (Bio-Rad) und 0,035% N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Bio-Rad) gestartet. Nach der Polymerisation wurde das Sammelgel, das aus 3,1% Acrylamid, 0,08% DATD, 0,1% SDS, 0,125M Tris pH 7,0 und 0,05% N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin bestand, darauf gegossen. Die Puffertanks enthielten 0,025M Tris, 0,192M Glycin, 0,1% SDS, pH 8,5. Die Elektrophorese wurde bei Zimmertemperatur mit konstanter Stromstärke von 5mA/cm² durchgeführt, bis die Pufferfront das Gelende erreicht hatte. Anschließend wurden die Gele in Essigsäure/Isopropanol/Wasser (1/1/4) mit 0,5% Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad) fixiert und gefärbt und mit Essigsäure/Isopropanol/Wasser (1/1/8) entfärbt. Die Gele wurden unter Hitze und Vakuum auf Whatman 3MM Filterpapier getrocknet. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine Mischung aus Myosin (200 000 d), β -Galaktosidase (116 000 d), β -Phosphorylase (96 000 d), Rinder-Serumalbumin (68 000 d), Ovalbumin (45 000 d) und Carboanhydrase (30 000 d) von Sigma, sowie Sojabohnen-Trypsininhibitor (21 000 d, Sigma) und Lysozym (14 300 d, Sigma) benutzt. Die Gele wurden bei Raumtemperatur mit ³H Ultro-Film (LKB) exponiert.

13. Blotting von Proteinen

Die in den Gelen aufgetrennten Proteine wurden nach Modrow (1983) durch Elektrophorese auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, BA85) übertragen (Western Blot). Dabei befindet sich das Gel mit der aufliegenden Nitrocellulose zwischen Whatman 3MM Papier, leitfähigem

Schaumstoff und zwei Kohleplatten, die über Platinelektroden den Strom übertragen. Schaumstoff und Filterpapier sind mit Blotting-Puffer (192mM Glycin, 25mM Tris, pH 8,5, 20% Methanol) getränkt. Der Transfer findet bei $3\text{mA}/\text{cm}^2$ für 2h statt. Anschließend wurde die Nitrocellulose 1,5h mit einer modifizierten Denhardts-Lösung präinkubiert (1mg/ml Ficoll 400, 1mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 16mg/ml Rinder-Serumalbumin, 0,1% Nonidet P40, 0,05% Gelatine in Borat-gepufferter Saline pH 8,2, Cohen G.H. et al 1984). Der Blot wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit dem Serum, das 1:50 in 154mM NaCl, 10mM Tris pH 7,4 verdünnt wurde, inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulose 4 - 6h bei mehrmaligem Pufferwechsel mit Gelatinepuffer gewaschen (50mM Tris pH 7,5, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,25% Gelatine, 0,5% Triton X100, 0,1% SDS). Der Blot wurde dann 2h mit Peroxidase-gekoppeltem Anti-Human-Immunglobulin (Dako) in 154mM NaCl, 10mM Tris pH 7,4 inkubiert (bzw. Anti-Kaninchen-Immunglobulin) und 1h bei mehrmaligem Pufferwechsel in Gelatinepuffer gewaschen. Nach einer Inkubation von 10 - 20Min. mit 0,5mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin und 0,01% Wasserstoffperoxid in 50mM Tris pH 7,6 treten die gefärbten Proteinbanden hervor. Die Färbung wird durch 1N Schwefelsäure und Nachwaschen mit Wasser gestoppt und die Nitrocellulose anschließend getrocknet.

C. Ergebnisse

1. Restriktionskartierung der EBV-DNA

Eine Grundvoraussetzung für die Analyse der Genexpression des Epstein-Barr Virus war die Erstellung einer korrekten Restriktionskarte der EBV-DNA mit den zur Verfügung stehenden DNA-Klonen. Insbesondere die Charon4A-Klone (Buell et al 1981), die gescherte DNA-Fragmente enthalten, mußten präziser charakterisiert werden. Aus dem Vergleich der publizierten, teilweise unvollständigen Restriktionskarten mit eigenen Restriktionsenzymverdaus sowohl der erhaltenen BamH1-EBV-DNA-Klone (Skare und Strominger 1980) als auch der Charon4A-Klone wurde eine BamH1-Restriktionskarte erstellt, die sich später, nachdem die vollständige Sequenz des Genoms bekannt wurde (Baer et al 1984), als richtig herausstellte. Das BamH1 e Fragment besteht aus drei nebeneinanderliegenden Fragmenten (e1 306bp, e2 507bp, e3 521bp), von denen jedoch nur eines als BamH1 Fragment kloniert vorlag, und die der Einfachheit halber auf Übersichtskarten als BamH1 e bezeichnet sind. Die Charon4A-Klone wurden bezüglich der BamH1-Restriktionskarte präzise kartiert (Abb.1).

Charon4A EB0-8 und EB26-36 wurden in einem Southern Blot nach BamH1-Verdau mit dem markierten BamH1 W Fragment hybridisiert, um die Grenzen in Bezug zum großen internen Repeat zu identifizieren. Dabei ergab sich, daß die Schnittstelle zwischen den BamH1 Fragmenten C und W nicht mehr im EB0-8 enthalten ist, der klonierte Teil des BamH1 C Fragments jedoch noch mit BamH1 W hybridisiert, d.h. daß ein Teil einer Einheit des großen internen Repeats in EB0-8 enthalten ist.

EB26-36 ergab ein komplizierteres Bild, da weder die vollständige BamH1 Y noch die vollständige BamH1 H Bande nach Verdau zu sehen sind, und die markierte BamH1 W Bande mit einer Bande von 7kbp hybridisiert. Diese Daten lassen folgende Interpretation zu: Der Klon enthält einen Teil des BamH1 Y Fragments, der wiederum Sequenzen des großen internen Repeats beinhaltet und darum mit dem BamH1 W Fragment hybridisiert. Die

Schnittstelle zwischen dem BamH1 Y und dem BamH1 H Fragment ist mit dem Repeat im BamH1 H Fragment deletiert. Im BamH1 Y Fragment befindet sich unmittelbar vor der Schnittstelle eine vierzehnmale Wiederholung einer neun Nukleotide langen Einheit. Es ist bekannt, daß bei Klonierung in Charon-Phagen, die recA-positive Bakterienstämme erfordern, klonierte Repeat-Elemente verloren gehen. Daher ist eine Deletion im BamH1 Y und H Fragment nicht verwunderlich. Das BamH1 F Fragment ist vollständig erhalten.

Der Verdau von Charon4A EB53-61 mit BamH1 zeigt, daß dieser Klon eine Deletion im BamH1 K Fragment aufweist, wahrscheinlich im Bereich des Repeats, analog zu den bereits publizierten Deletionen mehrerer Charon4A Klone, die diese Region beinhalten (Buell et al 1981).

2. In vitro Translation von EBV-Proteinen

Nach der in vitro Translation von RNA aus verschiedenen Zelllinien konnte eine Reihe von EBV-Proteinen identifiziert werden, vor allem nach Immunpräzipitation der Translationsprodukte mit einem hochtitrigen Pool von Patientenseren. Ohne Immunpräzipitation wurden die meisten der EBV-Proteine durch die große Anzahl der translatierten zellulären Proteine verdeckt. Im Vergleich zur Translation von BJA-RNA konnte mit RNA aus uninduzierten Raji-Zellen kein zusätzliches Protein identifiziert werden, das heißt, daß die latenten Genprodukte mit dieser Methode nicht erfaßt werden können. Mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen, induzierten B95-8-Zellen und induzierten Raji-Zellen (die nur frühe Proteine produzieren) konnten EBV-Proteine von 18kd bis 150kd translatiert werden (Abb.2). Einige dieser Proteine weisen in den einzelnen Zelllinien leichte Unterschiede im Molekulargewicht auf: Das 80kd-Protein ist in B95-8-Zellen etwas kleiner als in P3HR1-Zellen und das 84kd-Protein in B95-8-Zellen etwas größer als in P3HR1- oder Raji-Zellen. Des weiteren sind im Bereich 92kd bis 96kd und 34kd bis 36kd Unterschiede im Bandenmuster erkennbar.

Durch Präinkubation des Serums mit unmarkierten Proteinen aus EBV-positiven Zellen wird auch die Immunpräzipitation viraler Proteine inhibiert (Bayliss et al 1983). Die Präzipitation von einigen der

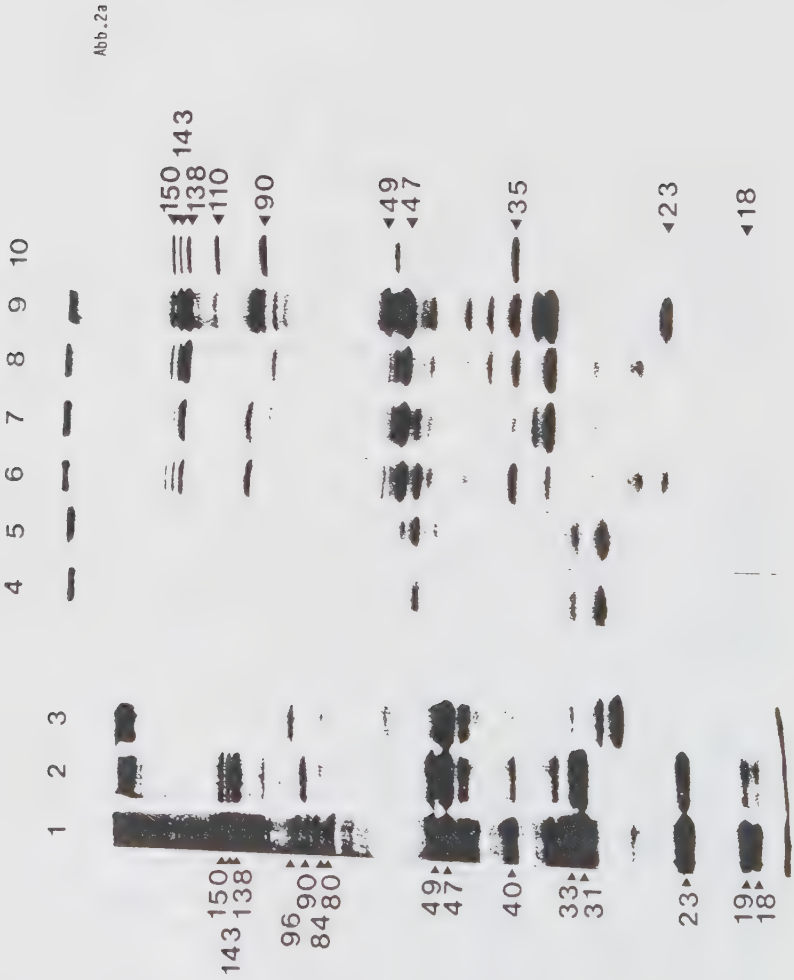




Abb.2b

Abb.2

Immunpräzipitation markierter EBV-Proteine

(1): in vitro Translation von B95-8-RNA (induziert), (2): in vitro Translation von P3HR1-RNA (induziert), (3): in vitro Translation von Raji-RNA (induziert), (4): in vitro Translation von BJA-RNA, (5): in vitro Translation von Raji-RNA, (6-9): in vitro Translation von P3HR1-RNA (induziert), (10): in vivo Markierung von superinfizierten Raji-Zellen, (A): in vitro Translation von P3HR1-RNA, (B): in vivo Markierung von P3HR1-Zellen.

Zur Immunpräzipitation wurde ein Pool hochtitriger Patientenserum verwendet, der vorher jeweils präinkubiert wurde mit unmarkierten Proteinen aus: (1-5,9,10,A,B): BJA-Zellen, (6): P3HR1-Zellen (induziert), (7): P3HR1-Zellen, (8): superinfizierten Raji-Zellen

translatierten Proteine konnte durch die verwendeten Extrakte aus P3HR1-, induzierten P3HR1- und superinfizierten Raji-Zellen nicht vollständig blockiert werden (z.B. 138kd, 47kd). In diesem Fall reicht die Menge der unmarkierten Proteine zur vollständigen kompetitiven Hemmung der Präzipitation durch die Antikörper nicht aus, die Antikörpertiter gegen diese Proteine sind also sehr hoch, beziehungsweise diese Proteine werden in vivo vergleichsweise gering translatiert. Die Präzipitation anderer Proteine wird einheitlich inhibiert (z.B. 90kd, 80kd). Eine dritte Gruppe von Proteinen wurde in den uninduzierten und induzierten P3HR1-Zellen sowie in den superinfizierten Raji-Zellen jeweils in unterschiedlichem Ausmaß produziert (z.B. 92kd, 84kd, 33kd, 31kd), wobei einige in uninduzierten P3HR1-Zellen mehr translatiert werden als in induzierten. Dies zeigt, daß die Synthese einzelner Proteine nur in bestimmten Phasen der Virusreplikation stattfindet und somit verschiedene Präparationen von RNA oder Proteinen in ihrer Zusammensetzung variieren können.

Ein erster Vergleich der in vitro translatierten Proteine mit in vivo markierten EBV-Proteinen aus superinfizierten Raji-Zellen und induzierten P3HR1-Zellen zeigt, daß einige Banden in vivo und in vitro an gleichen Positionen sind, während andere nur nach in vitro Translation oder nur nach in vivo Markierung auftreten. Zahl, Größe und Intensität der in vitro translatierten Proteine insgesamt war jedoch durchaus mit den bekannten, nach in vivo Markierung erhaltenen EBV-Proteinen vergleichbar.

Die in vitro Translation von Gesamt-RNA, sowie die Hemmung der Immunpräzipitation viraler in vitro translaterter Proteine mit EBV-Proteinen enthaltenden Zellextrakten zeigte, daß durch in vitro Translation der verwendeten RNAs eine repräsentative Gruppe von EBV-Proteinen erfaßbar ist. Eine Kartierung durch hybrid selected Translation war also möglich.

3. Kartierung von EBV-Proteinen durch hybrid selected Translation

Die RNA aus den jeweiligen Zellen wurde gegen klonierte DNA-Fragmente, die an kleine Nitrocellulosefilter gebunden waren, hybridisiert, die gebundene mRNA wieder vom Filter eluiert und in vitro translatiert. Dadurch können die Proteine den DNA-Regionen, von denen ihre mRNA transkribiert wird, zugeordnet werden.

3.1. Proteine aus induzierten P3HR1-Zellen

Mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen, in denen infektiöse Partikel synthetisiert werden, sollte das ganze Spektrum der Proteine des lytischen Zyklus erfaßt werden. Als DNA-Proben wurden verwendet (siehe Abb.1):

- 11 Charon4A-Klone; gescherte, überlappende Fragmente aus B95-8-Zellen, die nahezu das gesamte B95-8-Genom abdecken (Buell et al 1981).
- 28 BamH1-Restriktionsfragmente aus B95-8-Zellen, die mit Ausnahme der terminalen und einiger der kleinsten Fragmente das gesamte B95-8-Genom umfassen (Skare und Strominger 1980).
- Klone vom Stamm M-ABA, die die in B95-8-DNA deletierte Region beinhalten (H3D2, H3K2, H3D1) (Polack et al 1984b).
- Ein Klon der die terminalen Fragmente aus dem zirkulären M-ABA-Genom enthält (966-20) (Polack et al 1984b).
- Subklone des Charon4A EB90-99, die das BamH1 A Fragment weiter unterteilen (M311, M356).

Durch die Klone wurde somit das gesamte EBV-Genom größtenteils mehrfach repräsentiert und die Proteine konnten meist einem sehr kleinen Bereich des Genoms zugeordnet werden.

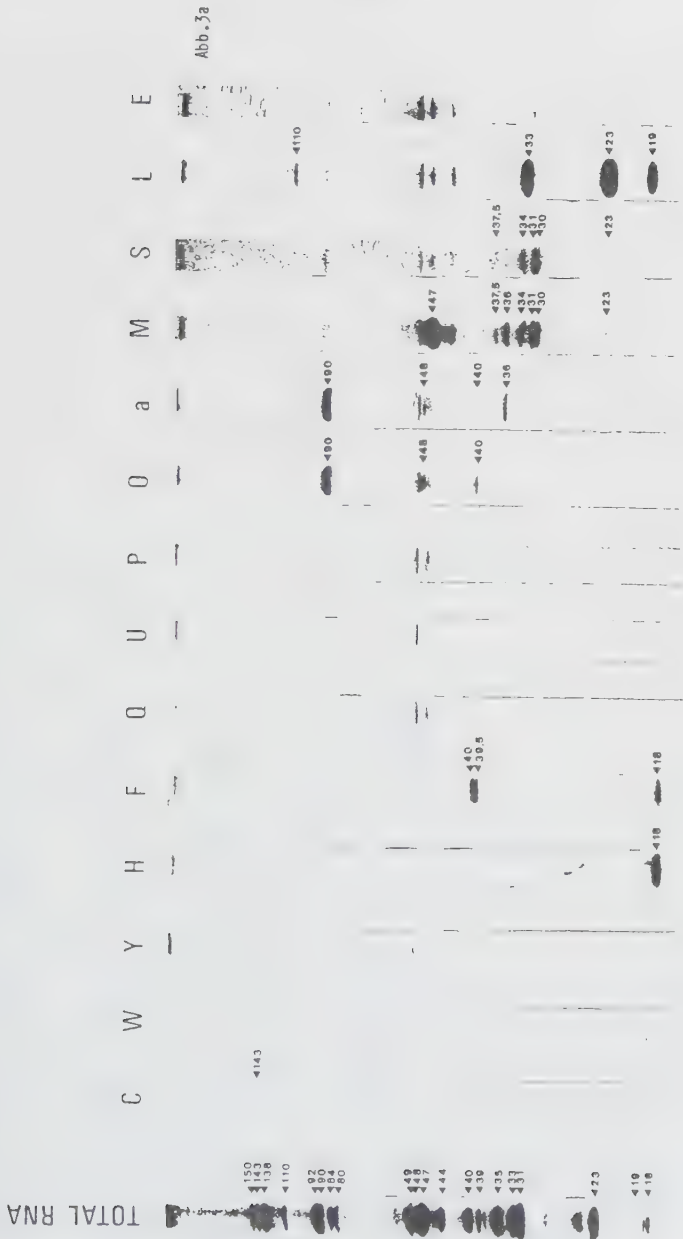
Die Translationsprodukte wurden direkt und nach Immunpräzipitation mit SDS-Polyacrylamid-Gelen untersucht. Wegen des geringeren Backgrounds ergab die Analyse der Translationsprodukte nach Immunpräzipitation eine größere Anzahl an Proteinen. Es konnten alle bei der Translation von Gesamt-RNA identifizierten EBV-Proteine einer definierten Region

zugeordnet werden und darüberhinaus einige zusätzliche Proteine kartiert werden. Dies erklärt sich daraus, daß durch die Hybridisierung eine Anreicherung von spezifischer mRNA erfolgt, Proteine mit gleichem Molekulargewicht existieren, die erst nach der Kartierung in verschiedenen DNA-Fragmenten aufgelöst werden können, und einige schwache Proteine nicht mehr von dominierenden Banden ähnlicher Größe verdeckt werden. Durch das Verfahren der hybrid selected Translation erhöhte sich jedoch auch die Anzahl der verkürzten Translationsprodukte, wodurch zusätzliche Proteine vorgetäuscht werden. Bei der hybrid selected Translation mit dem BamH1 D Fragment (Abb.3) sind beispielsweise eine Reihe von Proteinen vom Molekulargewicht 102kd - 150kd sichtbar. In anderen Versuchen ergab die in vitro Translation nur eine Bande von 150kd. Daher sind zumindest die meisten, wahrscheinlich aber alle der Proteine 102kd - 140kd verkürzte Produkte des 150kd-Proteins, die durch Fehler bei der in vitro Translation (vor allem durch vorzeitiges Abspringen der Ribosomen) entstehen. Auch die Proteine 41kd, 26,5kd, 25kd und 21kd in den BamH1 Fragmenten d und I stellen wahrscheinlich nur verkürzte Produkte des 49kd-Proteins dar, ebenso wie die Proteine 78kd und 75kd in den BamH1 Fragmenten Z und R verkürzte Produkte des 92kd-Proteins sind. Dies liegt nahe, da es jeweils schwächere Banden sind, die gleichzeitig in Fragmenten auftreten, die eindeutig für ein gemeinsames größeres, massiv produziertes Protein kodieren. In späteren Versuchen wurde dieser Verdacht bestätigt. Daß eine bestimmte Nukleotidsequenz in zwei verschiedene Proteine exprimiert wird, kann jedoch auch die in vivo Situation widerspiegeln.

Bei der Kartierung ergab sich, daß die mRNAs für fast alle Proteine von einem eng definierten Bereich der DNA abgelesen werden, daß also Start und Stop der Transkription jeweils in der Nähe des offenen Leserahmens erfolgen, und die meisten kartierten Proteine somit ihren eigenen Promotor haben.

Nach Hybridisierung mit allen verwendeten DNA-Klonen ergibt sich folgendes Bild (Abb.3, Abb.6):

Einige Proteine kartieren in einem einzelnen Restriktionsfragment oder gar nur einem Teil eines Fragments: Das 96kd-Protein im linken Teil,



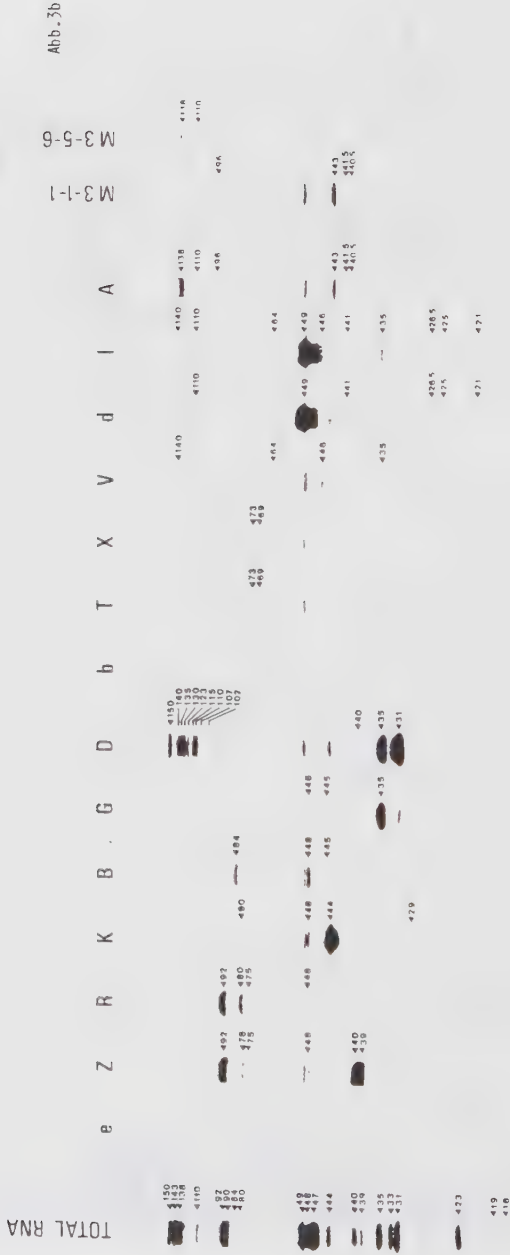


Abb. 3

Hybrid selected Translation mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen
 Die RNA wurde gegen die angegebenen BamHI-Restriktionsfragmente hybridisiert und anschließend in vitro translatiert. Die
 Translationsprodukte wurden mit einem Pool von Patientenseren, der vorher mit unmarkierten Proteinen aus BJA-Zellen präinkubiert
 worden war, immunpräzipitiert und in SDS-Polyacrylamid-Gelele aufgetrennt.

das 138kd-Protein im rechten Teil des BamH1 A Fragments, das 31kd-Protein im BamH1 D Fragment, das 84kd-Protein im BamH1 B Fragment (nicht im rechten Drittel), das 44kd-Protein im BamH1 K Fragment, die 39kd/40kd-Doppelbande im BamH1 Z Fragment, die Proteine 110kd, 33kd und 19kd im BamH1 L Fragment. Das 23kd-Protein kartiert hauptsächlich ebenfalls im BamH1 L Fragment, die mRNA hybridisiert jedoch in geringem Ausmaß auch mit den Fragmenten M und S. Das 47kd-Protein kartiert im BamH1 M Fragment und die 40kd/39,5kd-Doppelbande im BamH1 F Fragment. Das 143kd-Protein kartiert im BamH1 C Fragment. Inwieweit die Proteine 138kd und 143kd noch in den terminalen Fragmenten kartieren, konnte mit den verwendeten Klonen nicht festgestellt werden, da alle Klone, die die terminalen Fragmente enthalten, noch Teile des BamH1 A bzw. C Fragments beinhalten.

Einige Proteine kartieren in zwei benachbarten Fragmenten, das Transkript erstreckt sich also über die Restriktionsschnittstelle:

Das 18kd-Protein kartiert im BamH1 H und dem linken Teil des BamH1 F Fragments, das 90kd-Protein im BamH1 O und dem linken Teil des BamH1 a Fragments, das 36kd-Protein im BamH1 a und M Fragment, der Proteinkomplex 37,5kd, 34kd, 31kd und 30kd im BamH1 M und S Fragment, das 92kd-Protein im BamH1 Z und R Fragment, das 80kd-Protein im BamH1 R und K Fragment, das 45kd-Protein im BamH1 B und G Fragment, das 35kd-Protein im BamH1 G und dem linken Teil des BamH1 D Fragments, die 73kd/69kd-Doppelbande im BamH1 F und X Fragment, das 49kd-Protein im BamH1 d und I Fragment. Das 150kd-Protein kartiert im BamH1 D und c Fragment. Letzteres konnte erst eingezeichnet werden, nachdem es gemeinsam mit M. Mtz aus einem Charon4A-Klon subkloniert worden war und ist deshalb in den Abbildungen nicht enthalten.

In drei Fällen sind die Ergebnisse schwieriger zu beurteilen: Im BamH1 V und I Fragment wurden jeweils Proteine von 140kd, 64kd, 46kd und 35kd kartiert. Die beiden Fragmente sind durch das 1100 Nukleotide lange BamH1 d Fragment getrennt, in dem keines dieser Proteine kartiert. Da eine Reihe von anderen Proteinen jeweils in gleicher Intensität nach hybrid selected Translation mit dem BamH1 d und I Fragment auftraten, können technische Probleme nicht die Ursache für das Fehlen der Banden im BamH1 d Fragment sein. Die einfachste Erklärung wäre, daß die

mRNA(s) für diese Proteine gesplicet (gespalten) sind. Die Tatsache, daß vier identische Proteine in beiden Fragmenten translatiert wurden, spricht dafür, daß eine oder mehrere identische mRNA(s) mit diesen beiden Fragmenten hybridisieren. Die vier Proteine können außer durch vorzeitiges Beenden der Translation auch dadurch entstehen, daß nicht vollständig gesplicete mRNAs in der Präparation vorhanden sind, die in ein verkürztes Produkt translatiert werden, falls ein Stop-Signal in einem noch bestehenden Intron existiert. Es besteht auch die Möglichkeit, daß, ähnlich wie bei Herpes Simplex Virus Typ 1, Introns unterschiedlicher Länge ausgespliced werden (Frink et al 1983).

Auch im Falle des 110kd-Proteins, das im BamH1 d, I und im rechten Teil des BamH1 A Fragments kartiert, nicht jedoch im linken Teil, ist Splicing der mRNA die einfachste Erklärung.

Der dritte Fall ist das 48kd-Protein, das in den BamH1 Fragmenten Z, R, K, B und G kodiert, wobei die Hybridisierung mit dem BamH1 B Fragment am intensivsten ist. Mögliche Erklärungen wären wiederum, daß kurze Exons aus jedem dieser Fragmente durch Splicing zusammengefügt werden oder, daß eine mRNA mit unverhältnismäßig langen 3' oder/und 5' nicht translatierten Regionen existiert.

3.2. Proteine aus induzierten Raji-Zellen

Raji-Zellen produzieren nach Induktion nur frühe Proteine, wobei mindestens eines der frühen jedoch fehlt (p138). Die Ergebnisse der in vitro Translation von RNA aus induzierten Raji-Zellen deuten nicht darauf hin, daß mRNAs für späte Proteine in diesen Zellen vorhanden sind. In Analogie kann man daraus schließen, daß wie beim Übergang von immediate early zu frühen Proteinen bei EBV (Bayliss und Wolf in Vorbereitung) und Herpes Simplex Virus Typ 1 (Honess und Roizman 1974) und beim Übergang von frühen zu späten Proteinen bei Herpes Simplex Virus Typ 1 (Honess und Roizman 1974), das die späten Proteine anschaltende frühe Genprodukt (das in Raji-Zellen defekt ist oder fehlt) die Transkription der späten mRNAs erst initiiert und nicht über die Regulation der Translation der schon vorhandenen späten mRNAs wirkt. Alle durch in vitro Translation von RNA aus induzierten

Raji-Zellen identifizierten EBV-Proteine können daher als frühe Proteine betrachtet werden.

Die Proteine der hybrid selected Translation mit RNA aus induzierten Raji-Zellen wurden mit und ohne Immunpräzipitation analysiert. Nach Immunpräzipitation konnten wiederum mehr Proteine identifiziert werden. Um jedoch Proteine, gegen die in den verwendeten Seren keine Antikörper existieren, zu entdecken, wurden die Translationen auch direkt analysiert. Zu diesen Proteinen gehören in erster Linie Proteine, die sehr früh synthetisiert werden (Bayliss und Wolf 1981b), da diese nur in geringer Zahl produziert werden, nicht in Virionen eingebaut werden, bei der Lyse der Zellen eventuell nicht mehr vorhanden sind und somit das Immunsystem nicht stimulieren. Mit Ausnahme von einem konnten alle Proteine, die nach direkter Analyse identifiziert wurden (Abb.4), auch immunpräzipitiert werden (Abb.5). Dieses 105kd große Protein kartierte im Charon4A EB83-93. Auch die Tatsache, daß das Protein nicht bei jedem Versuch identifiziert werden konnte, deutet darauf hin, daß es sich möglicherweise um ein sehr frühes Protein handelt, dessen mRNA nur in einigen RNA-Präparationen, bei denen sich relativ mehr Zellen noch im sehr frühen Stadium befanden, und nur in geringer Menge vorhanden war.

Eine Reihe von Proteinen fanden sich in induzierten Raji-Zellen ebenso wie in induzierten P3HR1-Zellen (Abb.6): 18kd im BamH1 H und F Fragment, 40kd und 39,5kd im BamH1 F Fragment, 90kd im BamH1 O und a Fragment, 47kd im BamH1 M Fragment, 33kd, 23kd und 19kd im BamH1 L Fragment, 44kd im BamH1 K Fragment, 84kd im BamH1 B Fragment, 45kd und 48kd im BamH1 B und G Fragment, 35kd im BamH1 G und D Fragment, 73kd und 69kd im BamH1 T und X Fragment.

Im BamH1 Z Fragment kartierten Proteine von 38kd und 37,5kd und Proteine von 96kd, 83kd und 81kd im BamH1 Z und R Fragment. Mit RNA aus P3HR1-Zellen wurden Proteine von 40kd und 39kd bzw. von 92kd, 78kd und 75kd mit den jeweiligen DNA-Fragmenten kartiert. Es handelt sich also möglicherweise um verwandte Proteine, deren Molekulargewicht jeweils leicht verschieden ist.

Im BamH1 F Fragment wurden zusätzlich zu den mit P3HR1-RNA kartierten Proteinen solche von 47kd, 41kd und 35kd gefunden, sowie in den BamH1 Fragmenten M und S Proteine von 65kd und 70kd. Letztere konnten jedoch

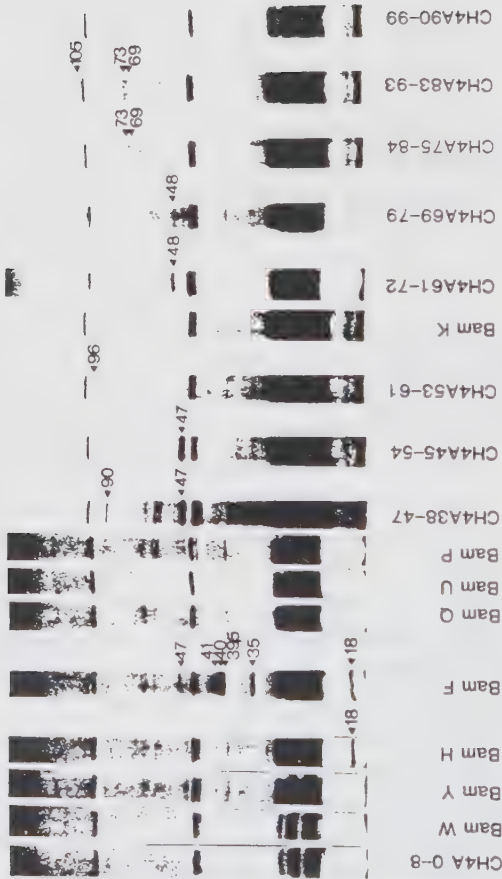


Abb. 4

Hybrid selected Translation mit RNA aus induzierten Raji-Zellen
Die RNA wurde gegen die angegebenen EBV-DNA-Klone hybridisiert und anschließend in vitro
translatiert. Die Translationsprodukte wurden direkt in SDS-Polyacrylamid-Gelelen aufgetrennt.

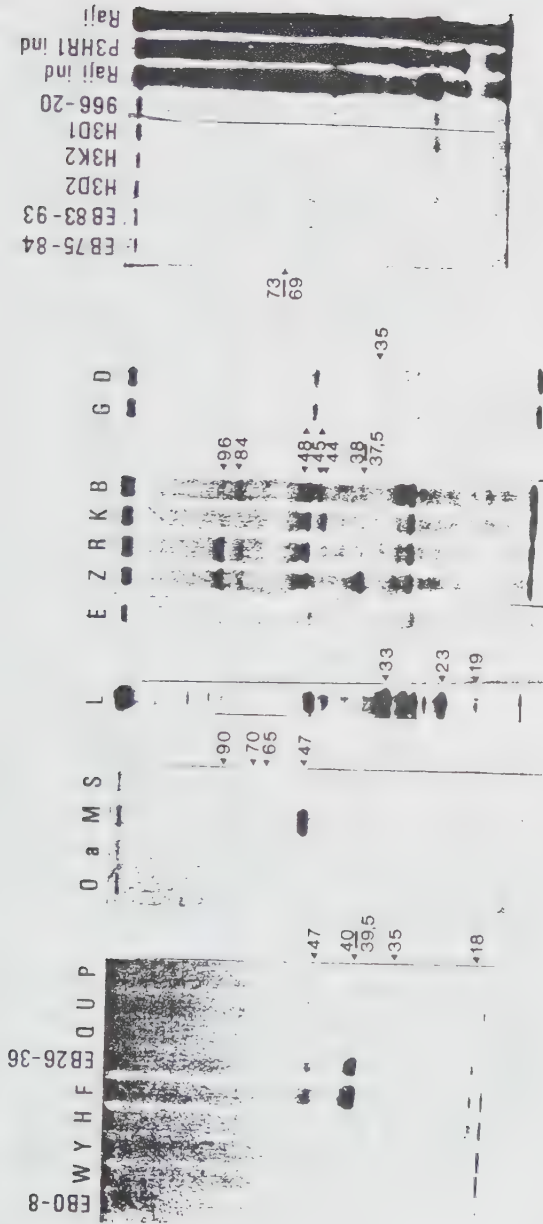


Abb.5

Hybrid selected Translation mit RNA aus induzierten Raji-Zellen
 Die RNA wurde gegen die angegebenen EBV-DNA-Klone hybridisiert und anschließend in vitro translatiert. Die
 Translationsprodukte wurden mit einem Pool von Patientenseren, der vorher mit unmarkierten Proteinen aus BJA-Zellen
 präinkubiert worden war, immunpräzipitiert und in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

später (siehe C.3.3.) auch mit RNA aus P3HR1- und B95-8-Zellen nach hybrid Selection translatiert werden.

3.3. Feinkartierung durch M13-Klone mit kleinen Inserts

Zwei Regionen des EBV-Genoms wurden zur Feinkartierung durch hybrid selected Translation gewählt, nämlich die BamH1 d, I und A Region sowie die BamH1 O, a, M, S und L Region. Die Hybridisierung erfolgte mit gescherten DNA-Fragmenten von maximal einigen hundert Nukleotiden, die in Cambridge in M13-Phagen kloniert und zur Sequenzierung des Genoms verwendet worden waren (Baer et al 1984). Die Klone wurden jeweils so gewählt, daß sie innerhalb oder außerhalb eines offenen Leserahmens lagen (siehe Abb.7, Abb.8). Ein generelles Problem bei der Hybridisierung mit den M13-Klonen aus Cambridge war, daß die inserierte EBV-DNA teilweise sehr kurz war. Die genaue Länge ist unbekannt, da die Inserts nicht vollständig sequenziert wurden. Wurden die M13-Klone den gleichen Bedingungen wie die BamH1 Klone bei der hybrid selected Translation unterworfen (52°C, 65% Formamid), konnten kaum Proteine identifiziert werden. Dies demonstriert die Stringenz der Bedingungen unter denen die Kartierung erfolgte. Wurde die Temperatur auf 45°C erniedrigt, was entsprechend der Formel zur Berechnung des Schmelzpunktes von Nukleinsäuren

$$T_S = 81,5 + 0,5(\%G + C) + 16,6\log(\text{Na}^+) - 0,6(\%\text{Formamid}) - 820/\text{bp}$$
 (Thomas und Dancis 1973, Thomas et al 1976) eine Hybridisierung mit Fragmenten bis zu 120bp Länge erlauben sollte, konnten alle dominierenden Proteine sicher zugeordnet werden. Gleichzeitig ergaben sich jedoch auch erhöhte Background-Probleme und schwache Banden aus der Kartierung mit den BamH1 Fragmenten konnten nicht identifiziert werden.

Die M13-Klone aus der Region BamH1 d, I, A wurden mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen hybridisiert. Dabei wurde die einzelsträngige DNA aus den Phagenpartikeln verwendet. Dem Leserahmen BVRF2, der die BamH1 Fragmente d und I verbindet und einen aktiven späten Promotor im BamH1 d Fragment besitzt (Farrell et al 1983a), konnte das 49kd-Protein zugeordnet werden (Abb.9). Dem Leserahmen BALF4 mit dem späten Promotor

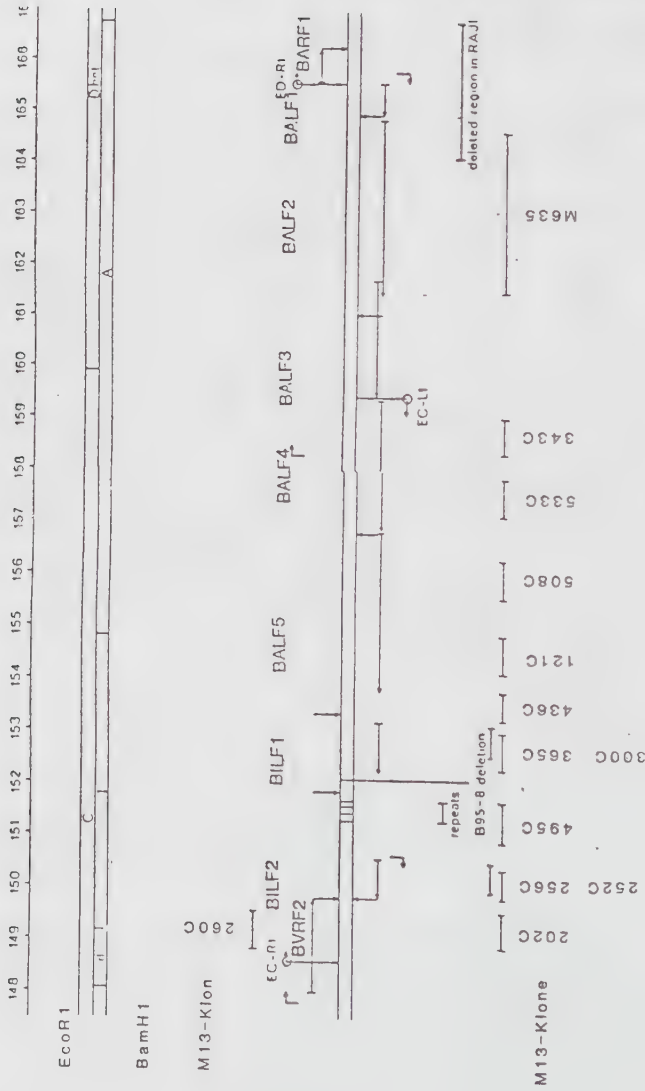


Abb. 7
Karte der verwendeten Klone zur Feinkartierung der BamHI dIA Region unter Verwendung einer Abbildung aus Baer et al (1984).
Nähere Erläuterungen hierzu siehe Abb. 35. Die Länge der M13-Klone ist nicht maßstabsgetreu.

Abb. 9a

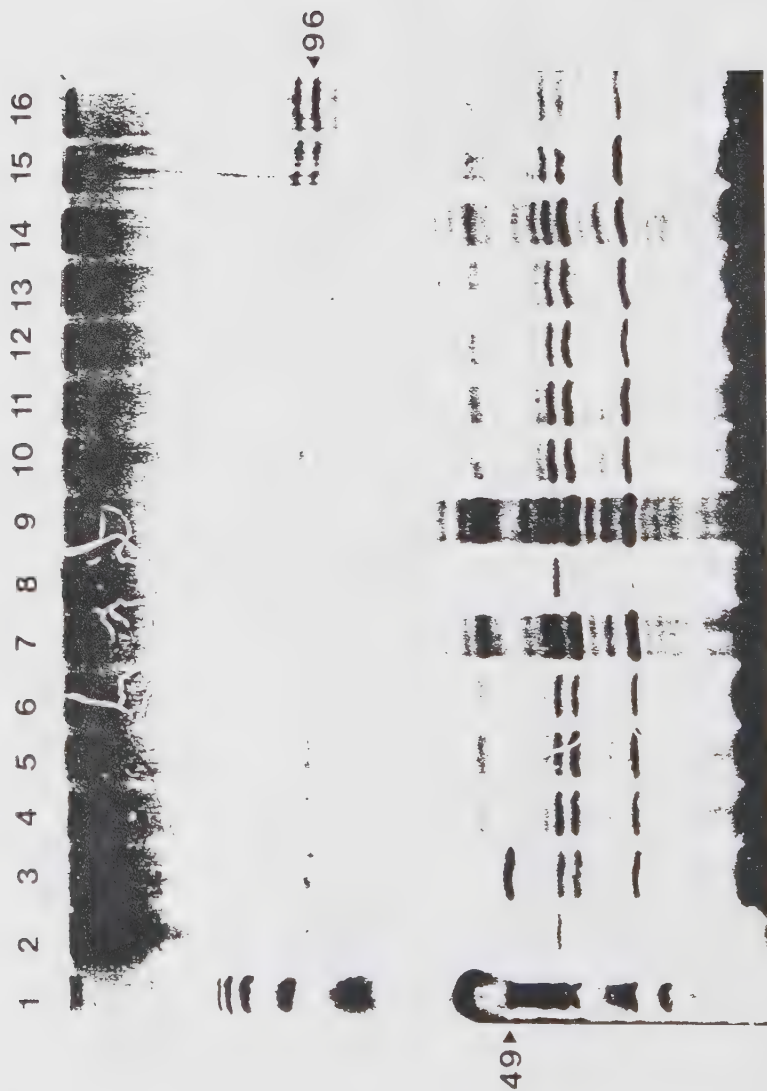




Abb. 9b

Abb. 9

Feinkartierung der BamH1 dIA Region

Hybrid selected Translation mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen unter Verwendung der in Abb. 7 dargestellten DNA-Klone. Die RNA wurde mit den angegebenen DNA-Klonen hybridisiert und anschließend *in vitro* translatiert. Einige Hybridisierungen wurden doppelt durchgeführt. (1): *In vivo* Markierung superinfizierter Raji-Zellen (2): Translation ohne Zugabe von RNA (3): 260C-DNA (4): 202C-DNA (5): 202C-DNA (6): 256C-DNA (7): 252C-DNA (8): 252C-DNA (9): 495C-DNA (10): 365C-DNA (11): 300C-DNA (12): 436C-DNA (13): 121C-DNA (14): 508C-DNA (15): 533C-DNA (16): 343C-DNA. Die Proben (2) bis (16) wurden direkt auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, die Probe (1) wurde immunpräzipitiert. Ebenfalls immunpräzipitiert wurde die hybrid selected translation mit pM635-DNA (=pUC635) neben einer Kontrolltranslation von RNA aus induzierten P3HR1-Zellen.

EC-L1 (Farrell et al 1983a) konnten die Proteine 96kd und 43kd zugeordnet werden. Das 43kd-Protein ist dementsprechend ein verkürztes Produkt des 96kd-Proteins. Beide Proteine konnten nicht mit RNA aus induzierten Raji-Zellen gefunden werden in Übereinstimmung damit, daß die Promotoren als spät eingeordnet wurden. Start und Stop der Transkription muß unmittelbar vor bzw. innerhalb und kurz nach dem Ende des Leserahmens erfolgen, wie auch nach der Lage der Promotoren und Polyadenylierungsstellen anzunehmen, da die nächstliegenden M13-Klone nicht mit der mRNA für diese Proteine hybridisieren. Mit dem Plasmid pM635 konnte dem BALF2 Leserahmen das 138kd-Protein zugeordnet werden. In der zweiten Region (BamH1 O bis L) wurden doppelsträngige M13-DNA und parallel RNA aus induzierten B95-8-, P3HR1- und Raji-Zellen zur Hybridisierung verwendet, um eventuelle Stammunterschiede zu charakterisieren. Dem Leserahmen BOLF2 konnte das 90kd-Protein zugeordnet werden (Abb.10). Die Transkription dieses Gens stoppt ebenfalls unmittelbar nach dem Leserahmen, da benachbarte M13-Klone sowie Charon4A EB45-54 DNA, die sich etwa von der Mitte des BamH1 a Fragments aus nach rechts erstreckt, nicht mit der mRNA für dieses Protein hybridisierten. Ein Klon aus dem BMRF1 Leserahmen hybridisiert stark, ein Klon aus dem BMRF2 Leserahmen schwach mit der mRNA für das 47kd-Protein. Da das Plasmid pCM1543, das von der Hind3 bis zur Xho1 Schnittstelle im BamH1 M Fragment reicht und 100bp vor der Polyadenylierungsstelle des BMRF2 Leserahmens beginnt, mit der mRNA für das 47kd-Protein hybridisiert, ist der M13-Klon aus dem BMRF2 Leserahmen wahrscheinlich überdurchschnittlich kurz und ergibt deshalb nur ein Signal, das knapp über dem Background liegt. Die mRNA für das 47kd-Protein startet nach allen vorliegenden Informationen also innerhalb des BamH1 M Fragments vor dem BMRF1 Leserahmen, wo auch ein aktiver früher Promotor kartiert wurde (Baer et al 1984), und endet frühestens nach der Hind3 Schnittstelle, wahrscheinlich an der Polyadenylierungsstelle unmittelbar nach dem BMRF2 Leserahmen (da die Intensität der Hybridisierung mit pCM1543 ebenfalls verhältnismäßig gering ist, überlappt die mRNA wahrscheinlich nur ein kurzes Stück). Ebenso sind wahrscheinlich die M13-Klone aus den Leserahmen BaRF1, BMLF1 und BSLF1 zu kurz, um unter den gewählten Bedingungen mit der

Abb. 10a

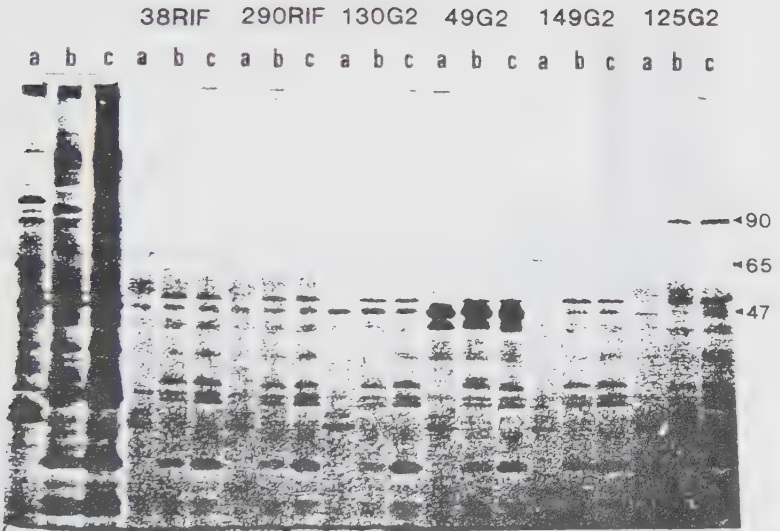


Abb.10b

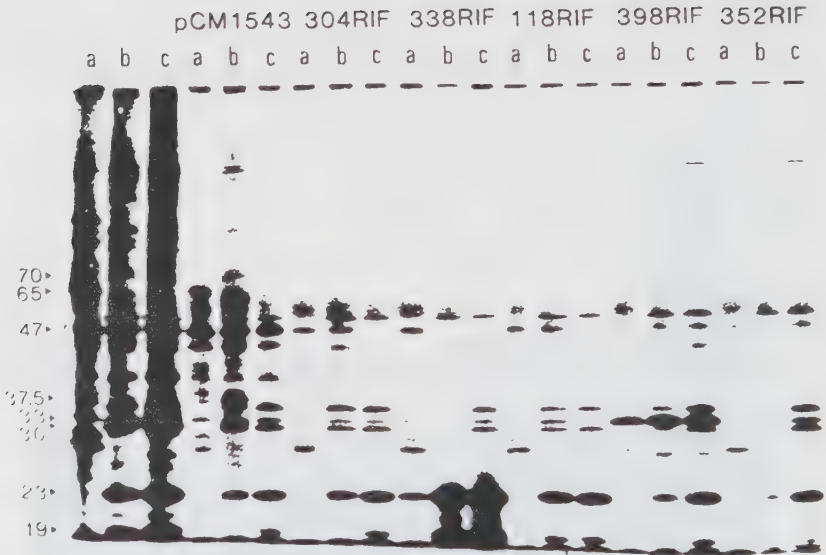


Abb.10

Feinkartierung der BamHI OaMSL Region

Hybrid selected Translation mit RNA aus induzierten Raji-Zellen (a), induzierten P3HR1-Zellen (b) und induzierten B95-8-Zellen (c) unter Verwendung der in Abb.8 dargestellten DNA-Klone. Kontrolltranslationen der jeweiligen Gesamt-RNA sind links aufgetragen. Die Translationsprodukte wurden mit einem Pool von Patientenserum, der mit unmarkierten Proteinen aus BJA-Zellen präinkubiert worden war, immunpräzipitiert und in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

gleichen Intensität wie die BamH1-Klone zu hybridisieren. Der M13-Klon aus dem Leserahmen BMLF1 erkennt ein 65kd-Protein. Mit dem Klon pCM1543, der den größten Teil des BMLF1 Leserahmens umfaßt, konnten in Bestätigung der Kartierung mit den BamH1 Fragmenten die Proteine 30kd, 31kd, 34kd und 37,5kd den Leserahmen an der Grenze der BamH1 Fragmente M und S, die eine gemeinsame Polyadenylierungsstelle besitzen, zugeordnet werden. Auffallend ist, daß diese Proteine nur nach Hybridisierung mit RNA aus P3HR1-Zellen auftreten. Da diese DNA-Region in den defekten P3HR1-Molekülen (het-DNA) enthalten ist (Cho et al 1984a, 1984b, Miller et al 1984) handelt es sich dabei möglicherweise um Expressionsprodukte der het-DNA. Dagegen können mit RNA aus allen drei Zelllinien die Proteine 65kd und 70kd diesen Leserahmen zugeordnet werden. Nach der Hybridisierung mit dem M13-Klon aus dem BSRF1 Leserahmen konnte kein Protein identifiziert werden in Übereinstimmung damit, daß alle mit dem BamH1 S Fragment kartierten Proteine bereits den Leserahmen BMLF1 und BSLF1 zugeordnet wurden.

Dem Leserahmen BLLF2 konnte durch den M13-Klon das im BamH1 L Fragment kartierte 33kd-Protein zugeordnet werden. Die mRNA für dieses Protein beginnt und endet wahrscheinlich ebenfalls kurz vor und nach dem offenen Leserahmen, wo auch jeweils entsprechende Sequenzelemente gefunden wurden. Das 33kd-Protein ist ebenso wie das 90kd- und das 47kd-Protein ein frühes Protein, da es auch mit RNA aus induzierten Raji-Zellen translatiert werden kann. Die Proteine besitzen in allen drei getesteten Zelllinien das gleiche Molekulargewicht.

Der M13-Klon aus dem BLRF2 Leserahmen hybridisiert mit der (den) mRNA(s) für das 23kd- und das 19kd-Protein. Es konnte nicht geklärt werden, ob der M13-Klon aus dem sehr kurzen BLRF1 Leserahmen, dessen Transkript bis zum Ende des BLRF2 Leserahmens reicht (Biggin et al 1984), für eines der Proteine kodiert, aber zu kurz ist um zu hybridisieren, oder ob der BLRF2 Leserahmen wirklich für die beiden intensiven Banden von 23kd und 19kd gleichzeitig verantwortlich ist. Beide Proteine sind auch nach Hybridisierung mit RNA aus induzierten Raji-Zellen identifizierbar, jedoch erst in P3HR1- oder B95-8-Zellen erreicht die Expression maximale Werte. (Auf Grund der massiven Expression in P3HR1- und B95-8-Zellen ziehen sich beide Proteine über

alle Klone als Background hin. In induzierten Raji-Zellen dagegen sind die nicht hybridisierenden Klone völlig negativ für diese Proteine, nur mit dem Klon aus dem BLRF2 Leserahmen wird die notwendige Anreicherung der mRNA durch die Hybridisierung erreicht.) Mit dem letzten M13-Klon aus dem BLLF1 Leserahmen hybridisiert die mRNA für das 110kd-Protein wiederum nur andeutungsweise. Durch später erwähnte Versuche (siehe C.4.) wird jedoch bewiesen, daß das im BamH1 L Fragment kartierte 110kd-Protein vom BLLF1 Leserahmen translatiert wird.

3.4. Kartierung von immediate early Proteinen

Die immediate early Proteine sind von besonderer Wichtigkeit zum einen wegen ihrer regulatorischen Funktion bei der kaskadenartigen Regulation der Proteinsynthese und zum anderen, da die Expression der immediate early Proteine am Übergang von der Latenz zur Virusproduktion steht und ihre Nichtexpression der Schlüssel zur Aufrechterhaltung der Latenz ist. Wegen der fehlenden Abschaltung der Wirtsproteinsynthese zu diesem frühen Zeitpunkt und der Existenz von zellulären Schockproteinen können diese Proteine durch in vivo Markierung nicht eindeutig identifiziert werden. Die hybrid selected Translation kann diese Probleme umgehen. Zur Kartierung der immediate early Proteine, also der Proteine, deren mRNA ohne vorherige Virusproteinsynthese transkribiert wird, wurde RNA aus Raji-Zellen verwendet, die gleichzeitig induziert und durch Cycloheximid gehemmt wurden. Aufgrund der toxischen Wirkungen des Cycloheximids mußte die RNA bereits einen Tag nach der Induktion isoliert werden, zu einem Zeitpunkt, als noch verhältnismäßig wenige Zellen in den lytischen Zyklus eingetreten waren. Da außerdem die immediate early Proteine teilweise nur in verschwindend geringer Menge produziert werden (Bayliss und Wolf 1981b), lassen sich nur zwei von ihnen, nämlich das 47kd-Protein im BamH1 M Fragment und das 18kd-Protein an der Grenze der BamH1 Fragmente H und F, durch hybrid selected Translation zweifelsfrei nachweisen (Abb.11). Ob diese Proteine auch noch im frühen Stadium der Virusproduktion transkribiert werden, oder ob die vergleichsweise massive Translation der mRNAs in ungehemmten Zellen auf lange Halbwertszeiten der mRNAs oder auf den

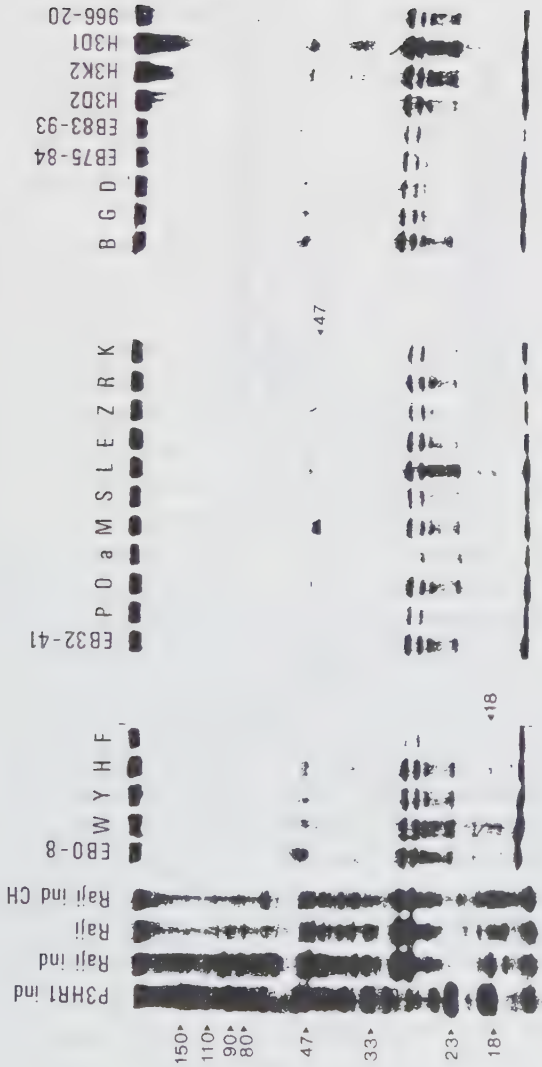


Abb.11

Hybrid selected translation mit RNA aus Raji-Zellen, die gleichzeitig mit der Induktion mit Cycloheximid gehemmt wurden und den angegebenen DNA-Klonen (siehe Karte Abb.6). Kontrolltranslationen von Gesamt-RNA aus induzierten P3HR1- und Raji-Zellen, aus nicht induzierten Raji-Zellen und aus Raji-Zellen, die gleichzeitig induziert und gehemmt wurden, sind links aufgetragen. Die Translationsprodukte wurden mit einem Pool von Patientenseren, der mit unmarkierten Proteinen aus BJA-Zellen präinkubiert worden war, immunpräzipitiert und in SDS-Polyacrylamid-Gelele aufgetrennt. Die Lokalisierung des 47kd-Proteins im BamH1 M und des 18kd-Proteins im BamH1 H und F fragment ist eindeutig zu erkennen (wie auch in Wiederholungen des Versuchs). Die Hybridisierung des 96kd-Proteins mit den BamH1 fragmenten Z und R ist vor allem im Original andeutungsweise zu erkennen.

Wegfall der toxischen Eigenschaften des Cycloheximids beruht, konnte nicht festgestellt werden. Ein auf ähnliche Weise kartiertes immediate early Protein bei Herpesvirus Saimiri kann ebenso mit RNA aus Zellen, die sich im frühen Stadium der Virussynthese befinden, massiver translatiert werden als im immediate early Stadium nach Cycloheximidhemmung (Hell persönliche Mitteilung).

Weitere mögliche immediate early Proteine sind das 96kd-Protein im BamHI Z und R Fragment und das 105kd-Protein im Charon4A EB83-93, das bereits im Verdacht stand ein sehr frühes Protein zu sein (siehe C.3.2.). Aufgrund ihrer geringen Zahl hybridisierten die mRNAs beider Proteine jedoch nur äußerst schwach und diese können deshalb nicht eindeutig identifiziert werden.

Nach der in vitro Translation von Gesamt-RNA aus Cycloheximid-gehemmten Zellen sind im Vergleich zur Translation von RNA aus unbehandelten Raji-Zellen mehrere Proteine zusätzlich zu sehen (Abb.11, Abb.12). Es kann sich dabei jedoch auch um zelluläre Schock-Proteine handeln. Zum deutlicheren Nachweis der zusätzlichen Proteine wurde das Serum vor der Immunpräzipitation mit einem unmarkierten Proteinextrakt, der die immediate early Proteine enthielt, präinkubiert (siehe Abb.12). Dieser wurde hergestellt, indem induzierte Raji-Zellen erst mit Cycloheximid und darauf mit Actinomycin D gehemmt wurden. Dadurch wurden erst immediate early Gene transkribiert und anschließend unter Actinomycin D translatiert, wobei die weitere Transkription währenddessen verhindert wird. Die Proteine, deren Immunpräzipitation dadurch blockiert wird, wurden daraufhin in einem zweiten Immunpräzipitationsschritt, in dem das Serum mit unmarkierten Proteinen aus EBV-negativen BJA-Zellen präinkubiert wurde, erneut einer Immunpräzipitation unterworfen. Durch diesen Versuch können Background-Banden, die beide Male präzipitiert werden, von immediate early Proteinen und Schock-Proteinen, die nur beim zweiten Schritt präzipitiert werden, unterschieden werden. Aus in vitro Translationen und auch nach in vivo Markierungen konnten in diesem Versuch jeweils Proteine von 18kd und 96kd im zweiten Schritt spezifisch gefällt werden. Im Abschnitt C.4. wird gezeigt, daß diese Proteine in vivo und vitro jeweils das gleiche Molekulargewicht aufweisen. Das 47kd-Protein, das posttranslational in ein 54kd-Protein

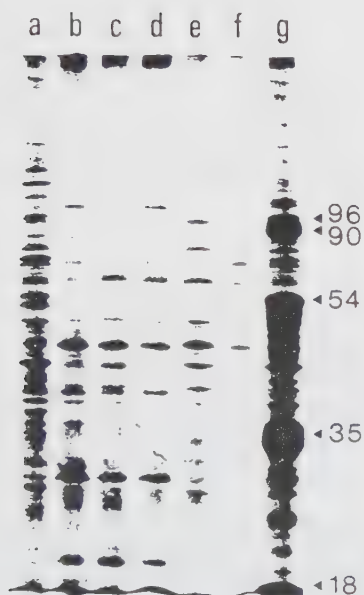


Abb.12

In vitro Translationen von Gesamt-RNA und in vivo Markierungen ganzer Zellen. Die markierten Proteine wurden mit einem Pool von Patientenserum immunpräzipitiert.

(a): In vivo Markierung von unbehandelten Raji-Zellen, immunpräzipitiert mit Serum, das mit Proteinen aus BJA-Zellen präinkubiert worden war.

(b): In vitro Translation von RNA aus unbehandelten Raji-Zellen, immunpräzipitiert mit Serum, das mit BJA-Proteinen präinkubiert worden war.

(d): In vitro Translation von RNA aus Raji-Zellen, die gleichzeitig induziert und mit Cycloheximid gehemmt wurden. Das Serum wurde präinkubiert mit unmarkierten Proteinen aus Raji-Zellen, die induziert und mit Cycloheximid gehemmt wurden und anschließend ohne Cycloheximid mit Actinomycin D inkubiert wurden. Dadurch wurden erst spezifisch die immediate early Gene transkribiert und anschließend translatiert, wobei dabei durch Actinomycin D die Transkription weiterer mRNAs verhindert wurde.

(c): Markierte Proteine aus (d), die nicht an Antikörper binden konnten, da diese durch die unmarkierten Proteine abgeblockt worden waren, wurden erneut mit dem Serum, das jedoch diesmal mit BJA-Proteinen präinkubiert worden war, immunpräzipitiert.

(f): In vivo Markierung von Raji-Zellen, die gleichzeitig induziert und mit Cycloheximid gehemmt wurden und anschließend ohne Cycloheximid unter Actinomycin D-Hemmung markiert wurden. Durch die Cycloheximid-Hemmung werden nur immediate early virale Gene transkribiert, die anschließend in markierte Proteine translatiert werden. Die Proteine wurden immunpräzipitiert mit Serum, das mit einem Überschuß von Proteinen aus unmarkierten Zellen, die genauso behandelt wurden (Raji-Zellen induziert plus Cycloheximid, anschließend Actinomycin D), präinkubiert worden war.

(e): Markierte Proteine aus (f), die nicht an Antikörper binden konnten, da diese durch die unmarkierten Proteine blockiert waren, wurden erneut immunpräzipitiert, diesmal wurde das Serum jedoch mit unmarkierten Proteinen aus BJA-Zellen präinkubiert.

(g): In vivo Markierung von induzierten Raji-Zellen, immunpräzipitiert mit Serum, das mit Proteinen aus BJA-Zellen präinkubiert worden war.

Durch die Immunpräzipitation in zwei Schritten können reine Background-Banden von spezifischen Banden unterschieden werden. Alle Banden in (f) und (d) sind unspezifisch, da das Serum mit homologen unmarkierten Proteinen präinkubiert worden war. Zusätzlich auftretende Banden in (e) und (c) stellen Proteine dar, die in induzierten, erst mit Cycloheximid dann mit Actinomycin D gehemmten Zellen zusätzlich zu den Proteinen in BJA-Zellen vorhanden sind und deshalb im ersten Immunpräzipitationsschritt geblockt, im zweiten jedoch präzipitiert werden.

Spezifisch blockiert wurden:

- Das 18kd-Protein aus in vivo und in vitro markierten Extrakten (im Abschnitt C.4. wird gezeigt, daß das 18kd-Protein nach in vitro Translation identisch ist mit einem 18kd-Protein nach in vivo Markierung).

- Das immediate early 47kd-Protein wird durch eine starke Background-Bande bei 47kd (siehe Spur b) überdeckt, durch die Blockierung kann nur eine Verstärkung der 47kd-Bande im zweiten Schritt erreicht werden. Das 47kd-Protein ist der Precursor zum posttranslational modifizierten 54kd-Protein (siehe C.4.). In (e) wird das 54kd-Protein spezifisch im zweiten Schritt präzipitiert.

- Ein 96kd-Protein aus in vivo und in vitro markierten Extrakten (im Abschnitt C.5. wird gezeigt, daß das im BamHI Z und R Fragment kartierte in vitro translatierte 96kd-Protein aus induzierten Raji-Zellen einem 96kd-Protein nach in vivo Markierung entspricht).

prozessiert wird (siehe C.4.), ist von einer zellulären Bande überlagert. Lediglich eine Anreicherung kann im zweiten Immunpräzipitationsschritt beobachtet werden. Die prozessierte Bande von 54kd wird jedoch eindeutig im zweiten Schritt spezifisch präzipitiert. Das 105kd-Protein kann wie erwähnt durch Immunpräzipitation nicht erfasst werden und tritt in dem Versuch daher nicht in Erscheinung.

3.5. Hybridisierung mit RNA aus unbehandelten Raji- und BJA-Zellen - Translation kreuzhybridisierender zellulärer Transkripte

Um sicherzustellen, daß alle identifizierten Proteine Virus-kodiert sind und um Kreuzhybridisierungen zu analysieren, wurde RNA aus EBV-negativen BJA-Zellen zur hybrid-selected Translation verwendet. Mit RNA aus unbehandelten Raji-Zellen wurde getestet, ob die latenten Genprodukte auch nach Anreicherung der mRNA durch hybrid-selected Translation nicht in vitro translatierbar sind. Nach hybrid selected Translation mit RNA aus unbehandelten Raji-Zellen konnten nur mit dem BamH1 K Fragment Proteine identifiziert werden. Die gleichen Proteine konnten jedoch auch nach Hybridisierung mit RNA aus BJA-Zellen translatiert werden (Abb.13). Es handelt sich hier also um zelluläre Produkte. In Raji-Zellen konnte somit auch durch hybrid selected Translation keines der latenten Proteine entdeckt werden. Das BamH1 K Fragment war die einzige Region, mit der zelluläre, transkribierbare mRNAs hybridisierten (Abb.14). Die translatierten Proteine von 84kd und 92kd waren nicht immunpräzipitierbar und konnten nur mit RNA aus nicht induzierten Zellen translatiert werden.

Da der EBNA1-Repeat wegen seiner Kreuzhybridisierung zu zellulärer DNA (Heller et al 1982b, Heller et al 1985) wahrscheinlich die Ursache für die Hybridisierung zellulärer mRNAs ist, wurde die Hybridisierung zusätzlich bei 58°C durchgeführt, um dem hohen GC-Gehalt des Repeats (74%) zu entsprechen. Die Erhöhung um 6°C ist einer Erhöhung des GC-Gehaltes um 12% analog (Thomas 1976). Auch unter diesen Bedingungen wurden die beiden Proteine identifiziert.

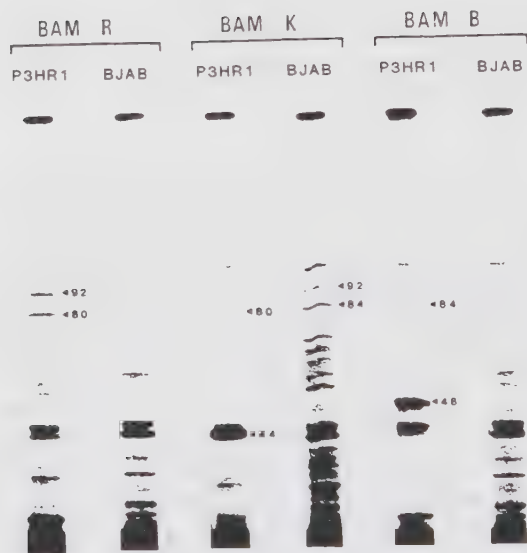


Abb.13

Hybrid selected Translation mit RNA aus BJA- und induzierten P3HR1-Zellen. Die Translationsprodukte wurden direkt in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

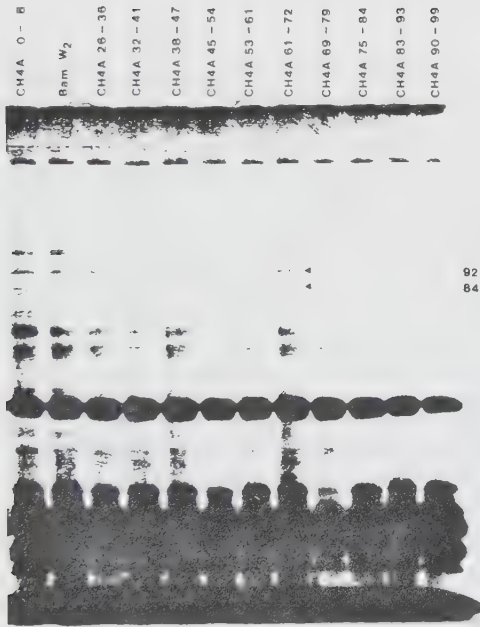


Abb. 14

Hybrid selected Translation mit RNA aus BJA-Zellen. Die Translationsprodukte wurden direkt in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

4. Zuordnung in vivo markierter Proteine zu den kartierten Translationsprodukten

Viele Proteine werden nach oder während der Translation modifiziert, beispielsweise durch Abspaltung eines Peptids, durch Anfügung von Zuckergruppen, Phosphorylierung oder Sulfatierung, wodurch sich ein verändertes Laufverhalten in SDS-Polyacrylamid-Gelen ergibt. Bei Herpes Simplex Virus Typ 1 wurde durch Pulse-Chase-Experimente festgestellt, daß 16 von 44 Proteinen derart posttranslational modifiziert sind, daß sich Größenunterschiede in SDS-Polyacrylamid-Gelen ergeben (Morse et al 1978). Da das in vitro Translationssystem zu diesen Modifizierungen normalerweise nicht in der Lage ist, können durch hybrid-selected Translation nur primäre Translationsprodukte kartiert werden. Um die kodierenden Regionen der nach in vivo Markierung von Zellen charakterisierten EBV-Proteine zu lokalisieren, ist es deshalb notwendig, die primären Translationsprodukte dieser Proteine zu identifizieren. Die einfachste Methode hierzu ist durch parallele Immunpräzipitation aus in vitro Translationen und in vivo markierten Zellextrakten die jeweiligen Proteine durch Bindung an denselben Antikörper zu identifizieren.

Da anfangs keine Monoklonalen Antikörper oder monospezifische Seren gegen einzelne EBV-Proteine zur Verfügung standen, wurden 25 einzelne Patientenserum zur Immunpräzipitation verwendet. Zusätzlich wurden die Seren dreier Kaninchen verwendet, die mit intakten Zellen verschiedener Zelllinien immunisiert worden waren (ein Geschenk von W.Jilg). Falls die Präzipitation eines Proteins aus der in vitro Translation jeweils mit der Präzipitation eines Proteins aus der in vivo Markierung korreliert war, und diese Proteine von keinem Serum nur in einer Markierung identifiziert wurden, wurden sie als wahrscheinlich identisch gewertet. Für die vergleichende Immunpräzipitation wurden induzierte P3HR1-Zellen (Abb.15) und induzierte Raji-Zellen (Abb.16) verwendet. Proteine vom Molekulargewicht 150kd, 143kd, 138kd, 90kd, 40kd und 18kd wurden jeweils gleichzeitig von allen Seren in vivo und in vitro erkannt oder nicht erkannt. Da mehrere verschiedene in vitro translatierte

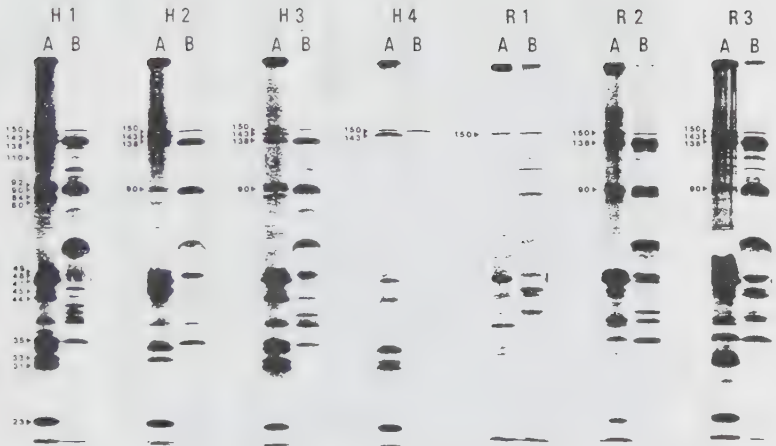


Abb.15

Vergleichende Immunpräzipitation mit einzelnen Seren von Extrakten aus in vivo markierten, induzierten P3HR1-Zellen und in vitro Translationen von RNA aus induzierten P3HR1-Zellen

(H): Patientenserum (R): Kaninchenserum

(A): in vitro Translation (B): in vivo Markierung

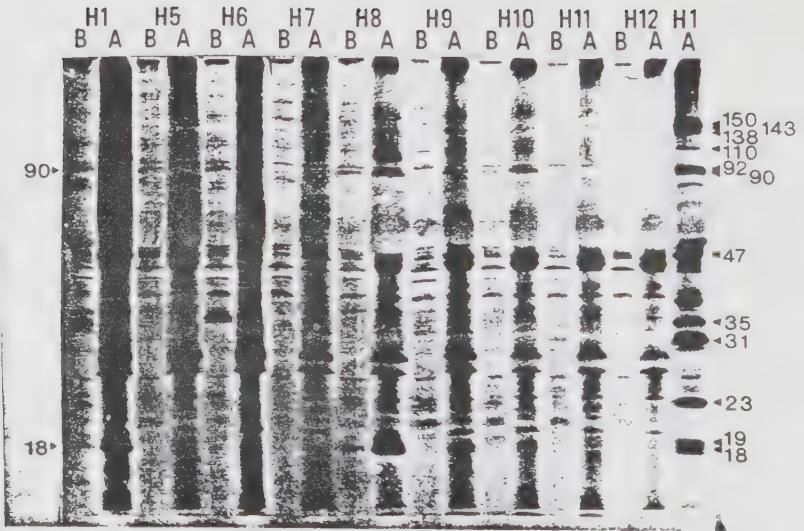


Abb.16

Vergleichende Immunpräzipitation mit einzelnen Patientenseren von Extrakten aus in vivo markierten, induzierten Raji-Zellen und in vitro Translationen von RNA aus induzierten Raji-Zellen.

(A): in vitro Translation (B): in vivo Markierung

40kd-Proteine kartiert worden waren, konnte die kodierende Region des 40kd-Proteins (in vivo markiert) nicht eindeutig definiert werden. Die anderen dieser in vivo markierten Proteine können somit mit großer Wahrscheinlichkeit ihren kodierenden Regionen zugeordnet werden. Alle Seren, die das in vitro translatierte 23kd-Protein massiv erkannten, präzipitierten auch ein 23kd-Protein nach in vivo Markierung, wenn auch die Bande erheblich schwächer war. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Protein, das in vivo und in vitro 23kd groß ist, durch in vitro Translation jedoch vergleichsweise stärker markiert werden kann.

Auffallend ist, daß alle diese Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach in vivo und in vitro Markierung einheitlich wandern, also nicht oder nicht merklich modifiziert sind. Eine Erklärung dafür wäre, daß in mindestens einem der Seren nur das primäre Translationsprodukt oder nur die prozessierte Form von den Antikörpern identifiziert wird. Zumindest in einem Fall läßt sich dies dokumentieren. Der Monoklonale Antikörper R3 (Pearson et al 1983) präzipitiert das 47kd-Protein aus dem BamH1 M Fragment nach in vitro Translation und das voll prozessierte 54kd-Protein sowie teilweise vorhandene Zwischenstufen aus in vivo markierten Zellextrakten. (Diese publizierten Ergebnisse - Pearson et al 1983 - wurden nachvollzogen und die Molekulargewichte unseren Daten entsprechend korrigiert.) Bei den verwendeten Patientenserum ist die gleichzeitige Präzipitation der beiden Proteine jedoch nicht durch alle Seren erfüllt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte mit einem von M.Motz zur Verfügung gestellten monospezifischen Kaninchenserum gegen das 138kd-Protein die Zuordnung des 138kd in vivo markierten Proteins bestätigt werden. Das Kaninchen wurde mit einem in Bakterien exprimierten Teil des Leserahmens, in dem das 138kd-Protein kartiert worden war (siehe C.3.3.), immunisiert. Dadurch konnte auch die Kartierung in diesem Leserahmen bestätigt werden (Abb.17). Ein zweites von M.Motz zur Verfügung gestelltes monospezifisches Kaninchenserum war gegen das Glycoprotein 350kd/250kd gerichtet. Das Serum wurde ebenfalls nach Immunisierung mit einem in Bakterien exprimierten Protein erhalten, und zwar wurde aus dem BamH1 L Fragment, in dem das

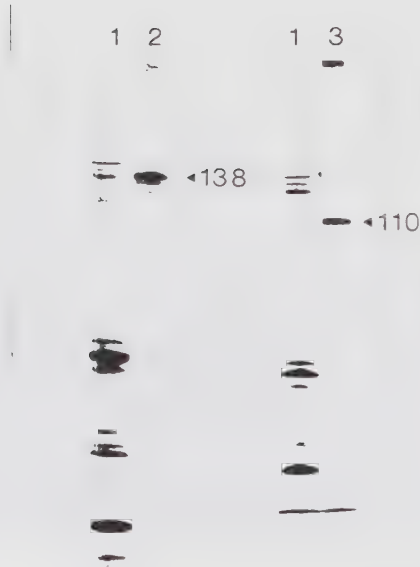


Abb.17

Immunpräzipitation von in vitro Translationen mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen

(1): Pool von Patientenserum

(2): Monospezifisches Serum gegen das in Bakterien exprimierte 138kd-Protein aus dem BALF2 Leserahmen

(3): Monospezifisches Serum gegen das in Bakterien exprimierte gp350/250 aus dem BLLF1 Leserahmen

Glykoprotein kartiert worden war (Hummel et al 1984), der Leserahmen BLLF1 exprimiert, der aufgrund von Sequenz- und Kartierungsdaten für das gp350kd/250kd zu kodieren schien. In den Zellen wird aus einem Teil der mRNA-Population für dieses Protein ein Fragment, das Repeat-Elemente enthält, herausgespliced (Biggin et al 1984, Beisel et al 1985). Von der prozessierten Form wird das gp250, von der unprozessierten Form das gp350 translatiert. Beide Proteine sind in etwa gleichen Mengen vorhanden. P3HR1-Zellen produzieren abweichend davon fast ausschließlich das gp250. Das durch hybrid selected Translation im BamH1 L Fragment kartierte 110kd-Protein wurde von diesem Kaninchenserum präzipitiert (Abb.17) - ebenso wie das gp250 (Jilg und Motz persönliche Mitteilung). Es handelt sich also bei dem 110kd-Protein um den Precursor (Vorläufer) des gp250. Weitere Zuordnungen in vivo markierter Proteine zu kartierten primären Translationsprodukten werden ausführlich im nächsten Kapitel beschrieben.

5. Charakterisierung der BamH1 Z Region

5.1. Zur Wahl dieser Region

Nach der Auswertung der bisher beschriebenen Ergebnisse zur Kartierung von EBV-Proteinen auf dem Genom wurde die Expression der BamH1 Z Region in mehreren Zelllinien näher untersucht. Die Gründe dafür waren:

- Das BamH1 Z Fragment hat an drei offenen Leserahmen teil (Abb.18), mit RNA aus P3HR1-Zellen wurden jedoch 6 Proteine durch hybrid selected Translation darin kartiert, mit RNA aus induzierten Raji-Zellen 5 Proteine.
- Die Ergebnisse der hybrid selected Translation mit dem BamH1 Z Fragment stehen teilweise im Widerspruch zu den im Laufe dieser Arbeit publizierten Kartierungen anderer Gruppen.
- Im BamH1 Z und R Fragment wurden mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen Proteine von 92kd, 78kd und 75kd, mit RNA aus induzierten Raji-Zellen Proteine von 96kd, 83kd und 81kd kartiert. Es handelt sich hier eventuell um verwandte Proteine.

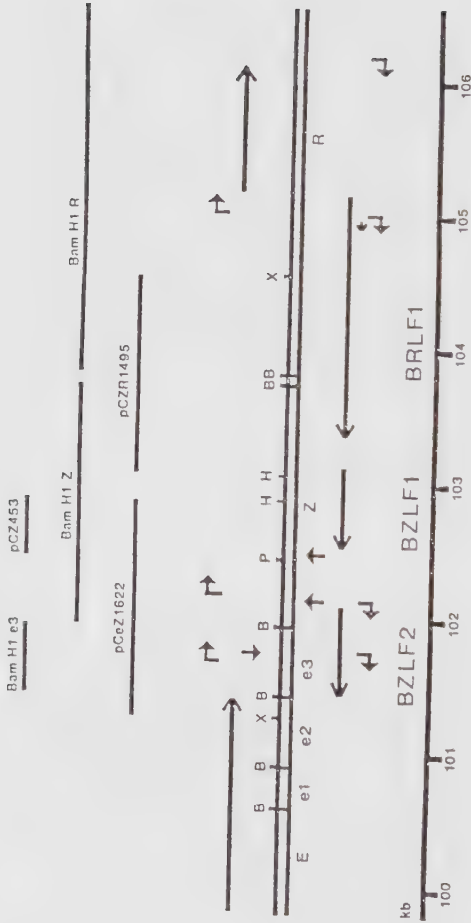


Abb.18

Schematische Darstellung der BamHI Z Region mit offenen Leserahmen ($\longrightarrow$), aus Sequenzdaten ermittelten Promotoren ($\rightarrow$), Polyadenylierungsstellen ($\downarrow$) und Restriktionsenzymststellen (B: BamHI, X: XhoI, P: PstI, H: HindIII). Die in den Versuchen verwendeten DNA-Klone sind ebenfalls dargestellt.

- Das 96kd-Protein ist möglicherweise ein immediate early Protein
- Ein Protein der Größe 92-96kd konnte nach in vivo Markierung nicht identifiziert werden.
- Im BamH1 Z Fragment wurde mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen eine Doppelbande von 40kd und 39kd, mit RNA aus induzierten Raji-Zellen eine Doppelbande von 38kd und 37,5kd kartiert. Es handelt sich hier möglicherweise ebenfalls um verwandte Proteine.
- Zumindest einem der in vitro translatierten 40kd-Proteine konnte mit den Patientenseren mit großer Wahrscheinlichkeit ein 40kd in vivo markiertes Protein zugeordnet werden. Es war jedoch unbekannt, ob es sich dabei um das 40kd-Protein aus dem BamH1 Z Fragment handelt, bzw. welches in vivo markierte Protein diesem entspricht.
- Das BamH1 e3 Fragment ist in Raji-DNA vollständig, das BamH1 Z Fragment teilweise deletiert.
- Das BamH1 e3 Fragment stand ursprünglich zur Kartierung nicht zur Verfügung. Nach dessen Klonierung konnte durch hybrid selected Translation kein Protein identifiziert werden, obwohl sich ein offener Leserahmen darin befindet.
- Ein wichtiger Grund war, daß der untersuchte Bereich nahezu exakt Teil der DNA der defekten P3HR1-Moleküle ist, denen regulatorische Eigenschaften bezüglich der Induktion des lytischen Zyklus zugeschrieben werden.

Diese Region bot sich also an, die Aussagekraft der gewonnenen Kartierungsdaten zu überprüfen und einmal exemplarisch einen in der hybrid selected Translation negativen Leserahmen sowie eine Region, in der im Verhältnis zu den Sequenzdaten zuviele Proteine kartiert wurden, näher zu analysieren. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Expression dieser Region außer in induzierten Raji- und P3HR1-Zellen auch noch in weiteren Zelllinien variiert (ein Hinweis dafür war ein unterschiedliches Laufmuster der Translationsprodukte von B95-8-RNA in diesem Bereich - siehe Abb.2), inwieweit die kartierten Proteine untereinander verwandt sind, ob die zu identifizierenden in vivo Proteine ebenfalls in der Größe variieren und ob Anzeichen der Expression der defekten DNA-Moleküle vorliegen.

Zur Lösung dieser Fragen wurden DNA-Fragmente, die charakteristisch für

die einzelnen Leserahmen sind, kloniert und zur hybrid selected Translation sowie für Northern Blots verwendet. Mit einzelsträngiger DNA konnte die Transkriptionsrichtung bestimmt werden. Große Teile aller drei Leserahmen wurden schließlich in *E. coli* exprimiert und Kaninchen mit diesen Proteinen immunisiert. Nach Immunpräzipitation mit den so gewonnenen monospezifischen Seren konnten in vitro translatierte Proteine und posttranslational modifizierte in vivo Proteine den Leserahmen eindeutig zugeordnet werden.

5.2. Subklonierung der Region

5.2.1. Klonierung einzelsträngiger und doppelsträngiger Hybridisierungsproben

Das im Cosmid pH79 klonierte SalI C Fragment aus M-ABA-DNA (Polack et al 1984b), das vom BamHI O bis ins BamHI R Fragment reicht, wurde mit den Restriktionsenzymen Hind3 und XhoI doppelverdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Drei Fragmente von 1495bp, 1543bp und 1622bp, die jeweils ein Hind3 und ein XhoI Ende hatten, wurden gemeinsam ausgeschnitten und in das Plasmid pUC19, das mit Hind3 und SalI geschnitten worden war, ligiert. Daraus entstand der Klon pCM1543, der einen Teil des BamHI M Fragments enthält und zur Kartierung verwendet wurde (siehe C.3.3.), sowie die Klone pCeZ1622 und pCZR1495 (siehe Abb.18). Die Klone wurden jeweils durch Restriktionskartierung identifiziert. Der Klon pCeZ1622 wurde weiter mit Hind3/PstI doppelverdaut und ein 453bp langes Hind3/PstI Fragment mit Hind3/PstI verdaulichem pUC19 ligiert. Daraus entstand der Klon pCZ453.

Die Insertionen der Plasmide pCeZ1622 und pCZR1495 wurden mit einigen Nukleotiden der pUC19 Sequenz durch Hind3/EcoRI wieder vollständig herausgeschnitten und mit doppelsträngiger M13 mp8-DNA, die ebenfalls Hind3/EcoRI verdaut worden war, ligiert. Daraus entstanden die Klone pPeZ1622 und pPZR1495. Da die Orientierungen der Hind3/XhoI Schnittstellen und damit auch die der Hind3/EcoRI Schnittstellen bei den beiden Fragmenten gegensätzlich sind, werden jeweils gegensätzliche

Stränge in M13-Partikel verpackt und deren einzelsträngige DNA kann in gegenseitiger Kontrolle zur Bestimmung der Transkriptionsrichtung verwendet werden (falls wie in diesem Falle die zu untersuchenden mRNAs sich über beide Klone erstrecken).

5.2.2. Klonierungen zur Expression der Leserahmen in Bakterien

Aus dem Plasmid pCeZ1622 wurde mit BamH1 das BamH1 e3 Fragment herausgeschnitten und mit dem ebenfalls mit BamH1 geschnittenem Vektor pUR278 ligiert. Im Plasmid pRe3-521 konnte nun der 3'-terminale Teil des Leserahmens BZLF2 als Fusionsprotein mit der β -Glaktosidase exprimiert werden (siehe Abb.19). Durch Restriktionsanalyse der DNA wurden Klone, die das Insert enthielten, bestimmt. Gleichzeitig wurden eine Reihe von Klonen durch Test auf Expression bezüglich der Orientierung des Inserts überprüft. 2 von 18 analysierten Klonen enthielten das BamH1 e3 Fragment, 5 von 42 weiteren getesteten Klonen und dazu die beiden in der DNA-Analyse positiven produzierten das Fusionsprotein. Im Falle der falschen Orientierung des BamH1 e3 Fragments wäre nur eine β -Galaktosidase von normaler Größe produziert worden, da in der anderen Orientierung des Inserts unmittelbar nach der Schnittstelle ein Stop-Codon folgt. Im Plasmid pRe3-521 werden vom Leserahmen BZLF2 ab der Aminosäure 55 die letzten 165 Aminosäuren exprimiert. Das Stop-Codon am Ende des Leserahmens wurde mitkloniert, somit endet das Fusionsprotein mit den letzten Aminosäuren des EBV-Proteins. Mit Hilfe eines Computerprogramms, das die mögliche Sekundärstruktur mit Berechnungen der hydrophilen und hydrophoben Regionen überlagert, wurde vor der Klonierung überprüft, ob sich mögliche antigene Strukturen im exprimierten Teil des Proteins befinden (Abb.20). Bei dem Protein aus dem Leserahmen BZLF2 handelt es sich um ein relativ hydrophobes Protein, dessen hydrophilste Stelle sich um die Aminosäure 75 und somit innerhalb des exprimierten Bereichs befindet. Auch bei der Expression des Leserahmens BRLF1 wurde darauf geachtet, daß mögliche antigene Stellen mitkloniert wurden. Das Protein enthält jedoch über die ganze Länge verteilt eine Reihe von höchstwahrscheinlich antigenen Stellen (Abb.21), so daß bei der

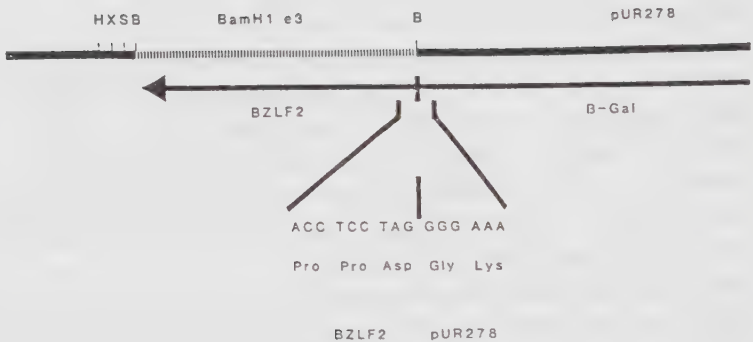


Abb.19

Schematische Darstellung des Plasmids pRe3-521 zur Expression des BZLF2 Leserahmens vom BamH1 e3 Fragment. Der EBV-Leserahmen wurde im richtigen Leseraster an das 3'-Ende des B-Galaktosidase-Leserahmen ligiert, so daß beide als Fusionsprotein exprimiert werden. Die Fusionsstelle ist im vergrößerten Maßstab mit Nukleotid- und Aminosäuresequenz gezeichnet. H: Hind3, X: Xba1, S: Sal1, B: BamH1

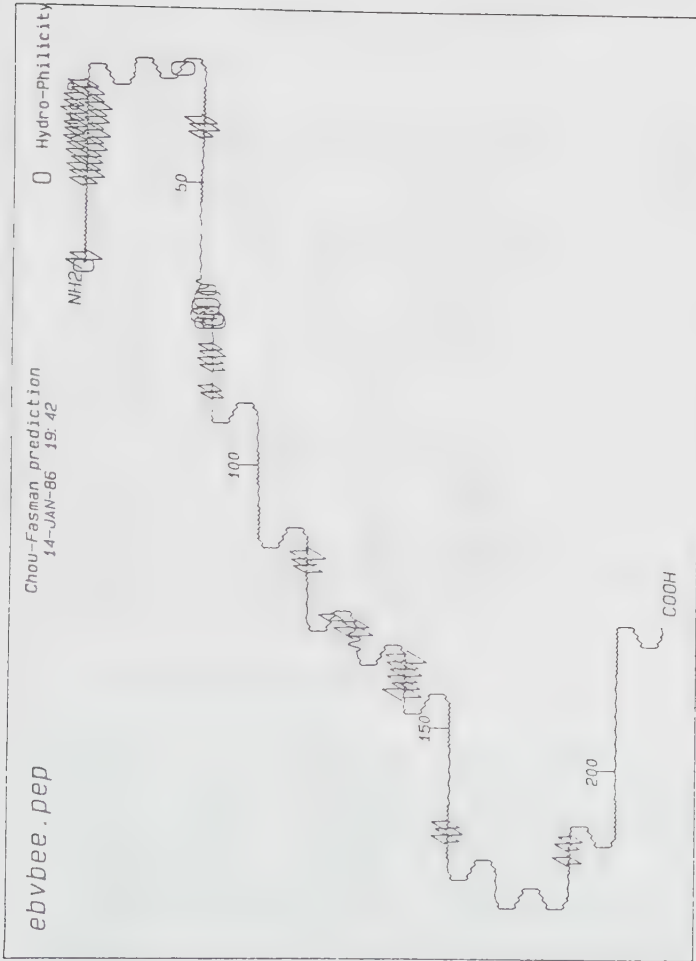


Abb.20

Graphische Darstellung der nach den Regeln von Chou und Fasman berechneten Sekundärstruktur des Proteins aus dem 821f2-Leserahmen. Eingezeichnet sind Alpha-Helices (~~~~), Beta-Faltblatt- (---) und Random Coil Strukturen (—) sowie Beta-Turns (o). Die hydrophilen (durch Ovale gekennzeichnet) und hydrophoben (durch Rauten gekennzeichnet) Regionen wurden über einen Durchschnitt von sieben Aminosäuren berechnet. Die Größe der Ovale bzw. Rauten korreliert mit der Intensität der Hydrophilizität beziehungsweise Hydrophobizität.

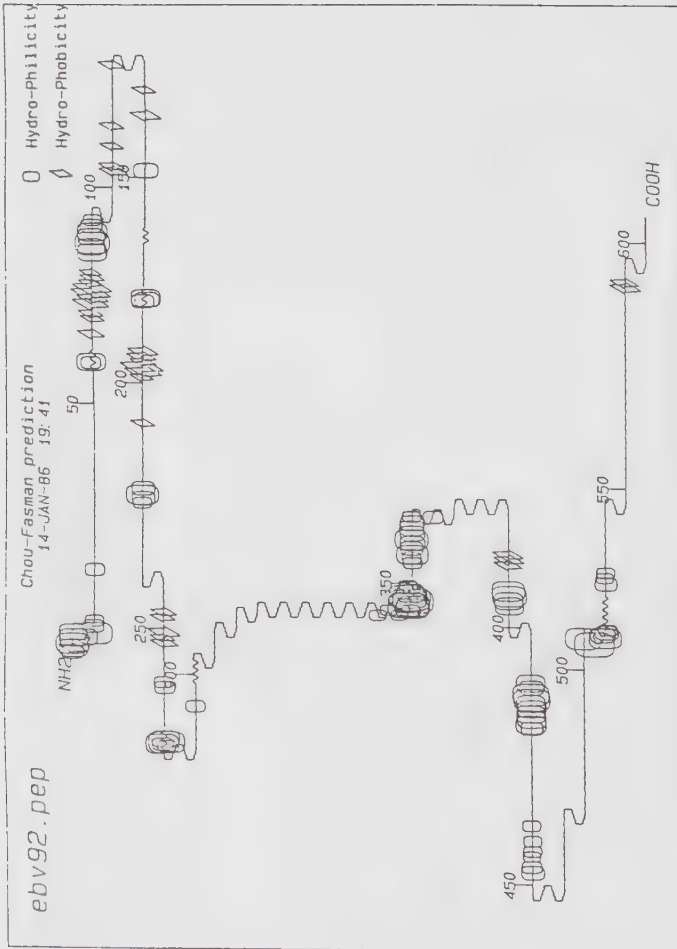


Abb.21
Graphische Darstellung der berechneten Sekundärstruktur des Proteins aus dem BRLF1 Leserahmen. Legende siehe Abb.20.

Expression eines größeren Teils des Proteins einige dieser Stellen enthalten sein sollten. Der in das Plasmid pCZR1495 inserierte Teil des Leserahmens wurde zusammen mit einigen Nukleotiden von pUC19 durch Hind3/Xba1 herausgeschnitten und mit ebenfalls Hind3/Xba1 verdautem pUR288 ligiert (Abb.22). Als Ergebnis der Klonierung werden im Plasmid pRZR1495 nach der β -Galaktosidase 400 Aminosäuren des 1800 Nukleotide langen BRLF1 Leserahmens als Fusionsprotein exprimiert. Die letzten Aminosäuren des Leserahmens bilden wiederum den Schluß des Fusionsproteins.

Im Leserahmen BZLF1 befindet sich eine nach dem Computerprogramm möglicherweise antigene Stelle zwischen den Aminosäuren 150 - 175 (Abb.23). Es war nicht möglich, durch Schnittstellen für irgendwelche Restriktionsenzyme in der EBV-Sequenz die entscheidenden Nukleotide direkt in einen pUR-Vektor zu ligieren, so daß der Leserahmen exprimiert würde. Erst über die Klonierung des Fragments in den Vektor PINIIB1 konnten die geeigneten Schnittstellen generiert werden (Abb.24). Aus dem Plasmid pCZ453 wurde mit Hind3/Xba1 die inserierte DNA mit einigen Nukleotiden der pUC19-Sequenz herausgeschnitten und mit ebenfalls Hind3/Xba1 verdautem PINIIB1 ligiert. Aus einem positiven Klon wurde dieses DNA-Fragment mit nochmals einigen zusätzlichen Nukleotiden, diesmal aus PINIIB1, mit BamH1/Xba1 herausgeschnitten und mit dem Plasmid pUR289 ligiert, das ebenfalls mit BamH1/Xba1 verdaut worden war. Als Ergebnis der Klonierung werden im Plasmid pRZ453 (Abb.25) nach der β -Galaktosidase die letzten 110 Aminosäuren des 600 Nukleotide langen BZLF1 Leserahmens exprimiert.

5.3. Kartierung durch hybrid selected Translation

Die Klone pRe3-521 = BamH1 e3, pCeZ1622, BamH1 Z, pCZ453, pCZR1495 und BamH1 R wurden mit RNA aus induzierten P3HR1-, B95-8-, Raji- und 833L-Zellen zur hybrid selected Translation verwendet (Abb.26). Virus aus 833L-Zellen wurde zur Transformation von Marmoset-Lymphozyten verwendet, woraus die Zelllinie B95-8 entstand (Miller et al 1972). Mit RNA aus B95-8- und 833L-Zellen sollte getestet werden, inwieweit die Proteine dieser Region, die in induzierten Raji- und P3HR1-Zellen im

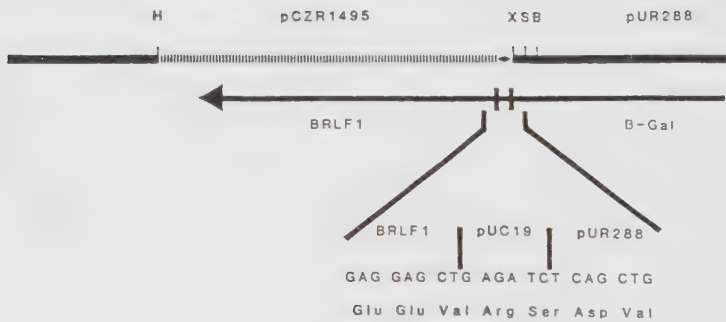


Abb.22

Schematische Darstellung des Plasmids pRZR1495 zur Expression des BRLF1 Leserahmens.
 Legende siehe Abb.19.

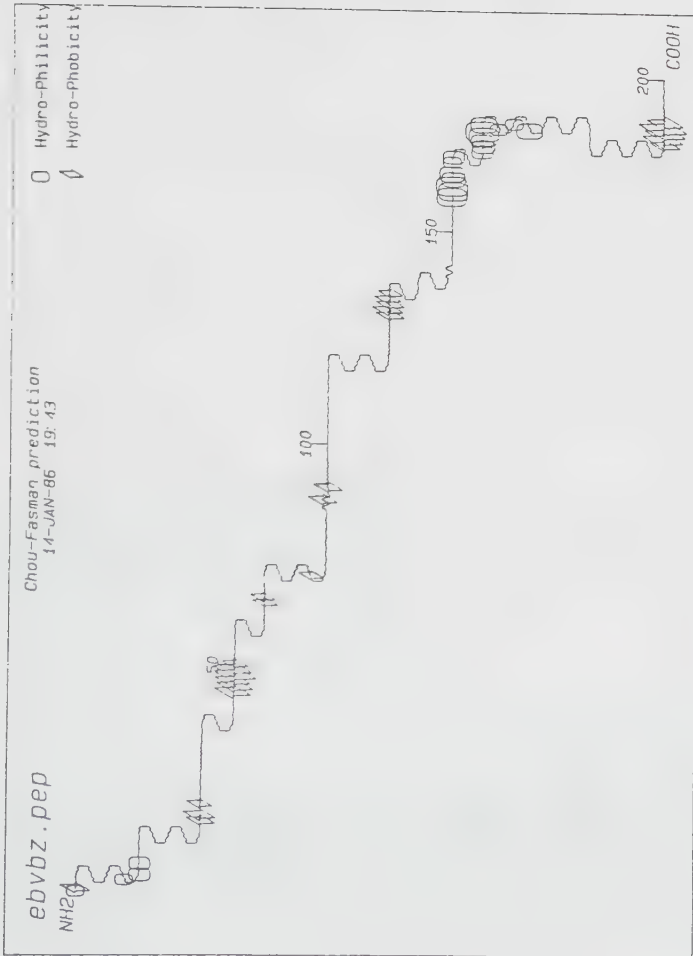


Abb.23

Graphische Darstellung der berechneten Sekundärstruktur des Proteins aus dem 82Lf1 Leseramen. Legende siehe Abb.20.

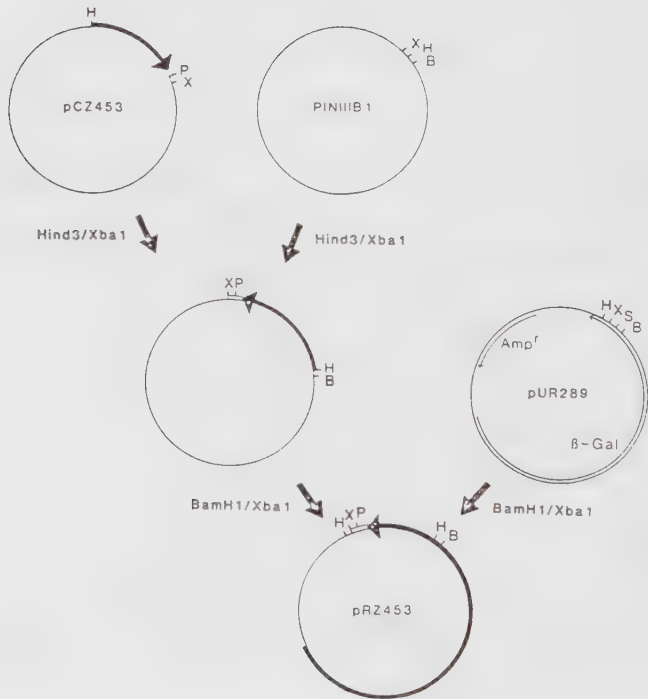


Abb.24

Konstruktionsschema des Plasmids pRZ453

Der Leserahmen BZLF1 (dicker schwarzer Pfeil), der als Hind3/Pst1 EBV-DNA Fragment in pUC19 im Plasmid pCZ453 vorlag, wurde in den Vektor PINIIIB1 kloniert. Aus diesem konnte er in den Vektor pUR289 kloniert werden, so daß er im richtigen Leseraster am 3'-Ende des β -Galaktosidase Leserahmens mit diesem fusioniert vorliegt. Das Fusionsprotein β -Galaktosidase-BZLF1 (dicker schwarzer Pfeil) ist nun im Plasmid pRZ453 exprimierbar. H: Hind3, P: Pst1, X: Xba1, B: BamH1

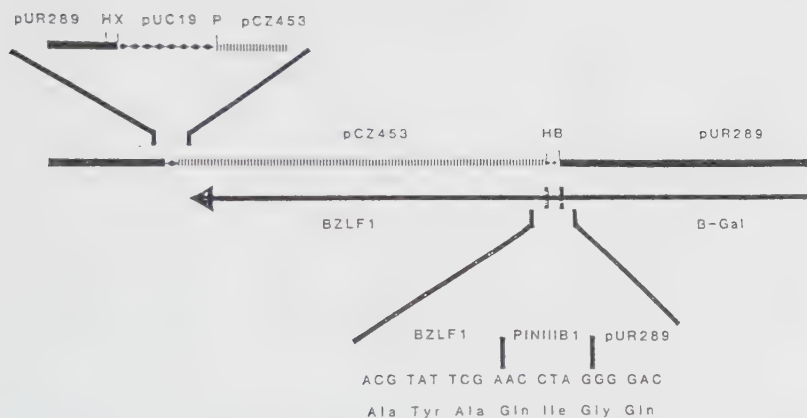


Abb.25

Schematische Darstellung des Plasmids pRZ453 zur Expression des BZLF1 Leserahmens. Wie aus dem Konstruktionsschema (Abb.24) hervorgeht, wird der Leserahmen als Fusionsprotein mit der β -Galaktosidase exprimiert. Dazwischen befindet sich ein kurzes DNA-Stück aus dem Plasmid PINIIB1. Am anderen Ende des Inserts befindet sich ein kurzes DNA-Stück aus dem Plasmid pUC19. H: Hind3, X: Xba1, P: Pst1, B: BamH1

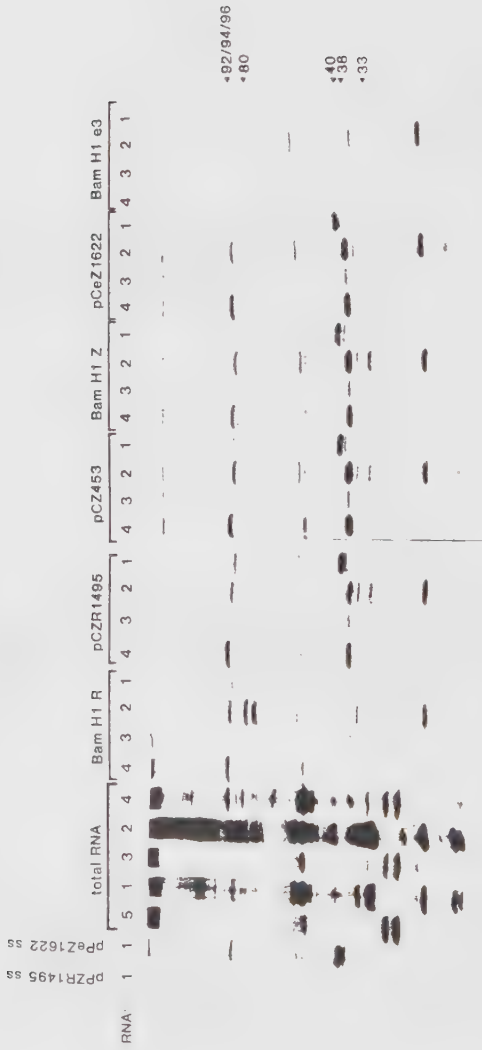


Abb.26

Hybrid selected Translation mit den Klonen der BamH1 Z Region. Zur Lage der Klone siehe Abb.18. Im Falle von pZr1495 und pZr1622 handelt es sich um einzelsträngige DNA aus M13 mp8 Phagen, in die jeweils die Inserts der Klone pCZR1495 und pCz21622 kloniert worden waren. Durch die gegensätzliche Polarität der Schnittstellen werden jeweils gegensätzliche Stränge verpackt, und somit gegensätzliche Stränge zur Hybridisierung verwendet. (1): RNA aus induzierten PZHR1-Zellen, (2): RNA aus induzierten 895-8-Zellen, (3): RNA aus induzierten 833L-Zellen, (4): RNA aus induzierten Raji-Zellen, (5): RNA aus nicht induzierten Raji-Zellen

Molekulargewicht variieren, sich seit der Etablierung der B95-8-Zellen veränderten.

Nach hybrid selected Translation mit dem BamH1 e3 Fragment konnte kein Protein identifiziert werden. Mit dem BamH1 R Fragment konnte ein möglicherweise spätes Protein von 80kd identifiziert werden (in Bestätigung der vorherigen Daten). Außerdem konnte nach Hybridisierung mit dem BamH1 R ebenso wie mit allen weiteren Fragmenten ein 92kd-Protein mit P3HR1-RNA, ein 94kd-Protein mit B95-8- und 833L-RNA und ein 96kd-Protein mit Raji-RNA translatiert werden. Der Leserahmen BRLF1 schien für ein Protein zu kodieren, das in 3 Zelllinien leicht unterschiedliche Größe aufweist. Die mRNA dieses Proteins hybridisiert noch mit pCZ453, mit BamH1 e3 jedoch nicht mehr.

Mit den Fragmenten pCeZ1622, BamH1 Z, pCZ453 und pCZR1495 konnte darüberhinaus mit P3HR1-RNA die 39kd/40kd-Doppelbande, mit B95-8-, 833L- und Raji-RNA jeweils eine 37,5kd/38kd-Doppelbande identifiziert werden. Die mRNA(s) für diese Proteine scheint völlig innerhalb des BamH1 Z Fragments zu kodieren. Auffallend ist, daß die Größe aller Proteine zwischen B95-8- und 833L-Zellen identisch ist, während in den beiden anderen Zelllinien Verschiebungen auftreten. Mit RNA aus B95-8-Zellen allein kann mit dem BamH1 Z Fragment und allen zumindest teilweise damit überlappenden Fragmenten zusätzlich ein 33kd-Protein translatiert werden.

Bei der Verwendung der einzelsträngigen DNA aus den M13-Phagen pPeZ1622 und pPZR1495 zeigte sich, daß die mRNAs aller mit doppelsträngiger DNA identifizierten Proteine von ein und demselben Strang abgelesen werden, nämlich von linken Strang, der in pPeZ1622 verpackt wird. Mit dem rechten Strang von pPZR1495 konnte kein Protein identifiziert werden.

Wie bereits bei den vorherigen Versuchen erscheinen nach allen Hybridisierungen mit der mRNA für das 92kd/94kd/96kd-Protein auch zwei Proteine von etwa 80kd. Diese Proteine stellen wahrscheinlich verkürzte Produkte des 94kd-Proteins dar, die vor allem nach hybrid selected Translation gebildet werden.

5.4. Kartierung durch Northern Blots

RNA aus induzierten P3HR1-, B95-8-, Raji- und 833L-Zellen sowie aus nicht induzierten Raji- und BJA-Zellen wurde in Formaldehydgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Die Blots wurden mit markierter DNA der Klone pCZR1495, BamH1 Z und BamH1 e3 hybridisiert (Abb.27). Alle drei Fragmente identifizierten eine RNA von 5,4kbp in allen induzierten Zelllinien, wobei das Molekulargewicht in induzierten Raji-Zellen etwas vermindert ist. Die Fragmente BamH1 Z und pCZR1495 hybridisierten mit einer RNA von 4,3kbp aus den vier produzierenden Zelllinien. Nur in RNA aus B95-8-Zellen wurde mit beiden Fragmenten eine Bande von 1,1kbp entdeckt. Das BamH1 Z Fragment hybridisierte als einziges mit einer Bande von 1,3kbp aus den vier induzierten Zelllinien.

5.5. Expression der Proteine in Bakterien und ihre Reinigung

Die exprimierten Mengen an Fusionsprotein von allen drei offenen Leserahmen wurden durch Coomassie-Färbung in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennter Bakterienlysate überprüft (Abb.28). Die Fusionsproteine reagierten in Western Blots mit dem Pool EBV-spezifischer Seren massiver als reine β -Galaktosidase (Abb.29). Die Seren erkennen also wahrscheinlich die EBV-spezifischen Teile der Proteine, was bedeutet, daß im richtigen Leseraster Proteine exprimiert wurden, gegen die die Patienten Antikörper besitzen.

Trotz des Schutzes durch die β -Galaktosidase werden die Fusionsproteine nicht als Banden einheitlicher Größe exprimiert. Das längste Fusionsprotein (pRZR1495) ist naturgemäß am stärksten dem Abbau ausgesetzt. Es ergibt sich ein Proteinschmier von ca. 180kd bis 120kd mit dominierenden Banden bei 180kd, was dem vollen Produkt entspricht, 160kd und 120kd. Entweder wird die Translation der Proteine preferentiell an diesen Stellen gestoppt, oder die Proteine werden bevorzugt bis zu diesen Stellen abgebaut. Die beiden anderen Leserahmen werden in Proteine von etwa 135kd - dem vollständigen Produkt - und etwa 120kd translatiert. Auffallend ist, daß bei allen drei Leserahmen verhältnismäßig viele Proteine kurz nach der Fusionsstelle stoppen.

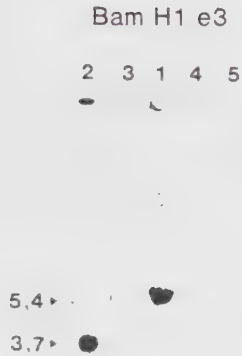


Abb.27a

Northern Blot mit dem nick-translatierten BamH1 e3 Fragment.

(1): RNA aus induzierten P3HR1-Zellen, (2): RNA aus induzierten B95-8-Zellen, (3): RNA aus induzierten 833L-Zellen, (4): RNA aus induzierten Raji-Zellen, (5): RNA aus nicht induzierten Raji-Zellen

Die Spur 2 ist kürzer exponiert als der restliche Blot. Die Länge der hybridisierenden RNAs ist in kbp angegeben.

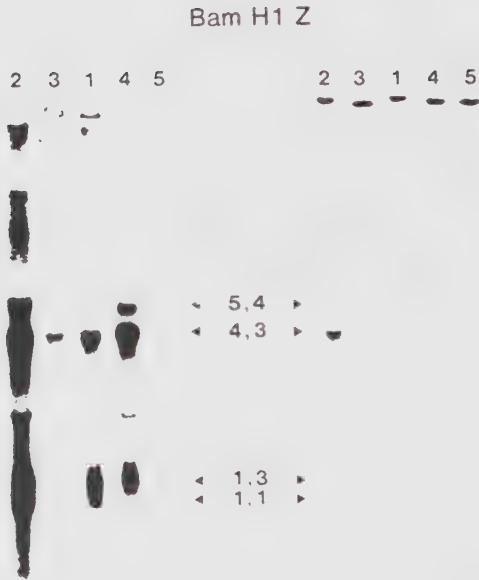


Abb.27b

Northern Blot mit dem nick-translatierten BamH1 Z Fragment

Eine kurze und eine lange Exposition sind gegenübergestellt. Legende siehe Abb.27a.



Abb.27c

Northern Blot mit dem nick-translatierten Plasmid pCZR1495

Von den Spuren 2 und 3 sind zwei unterschiedliche Expositionszeiten abgebildet. Legende siehe Abb.27a.

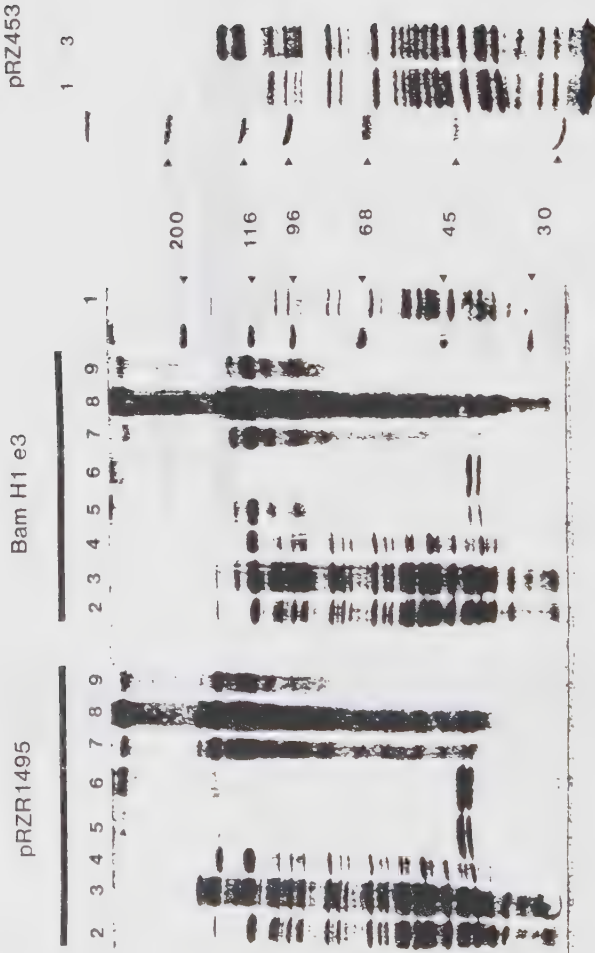


Abb. 28

Expression der Leserahmen in Bakterien und Reinigung der Fusionsproteine – Coomassie-Färbung
 Lysierte Bakterien, die nach Induktion die Proteine der jeweiligen Expressionsplasmide produzierten,
 sowie Proben der einzelnen Reinigungsschritte wurden in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und
 anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.
 Bakterien ohne Plasmid (1), Bakterien mit pUR-Vektor ohne Insert (2), Bakterien mit pUR-Vektor mit dem
 jeweiligen Insert (3), in 3% Triton löslicher Anteil der lysierten Bakterien mit Insert (4), der
 unlösliche Anteil wurde in 8M Harnstoff aufgenommen, der darin wiederum unlösliche Anteil (5)
 abzentrifugiert, der gelöste Anteil schrittweise gegen 3M Harnstoff dialysiert, wobei die Fraktion (6)
 ausfiel. Die in 3M Harnstoff gelösten Proteine (7) wurden anschließend gegen PBS dialysiert, dabei fiel
 der Großteil aus (8) und konnte abzentrifugiert werden, ein kleiner Teil blieb in Lösung (9).

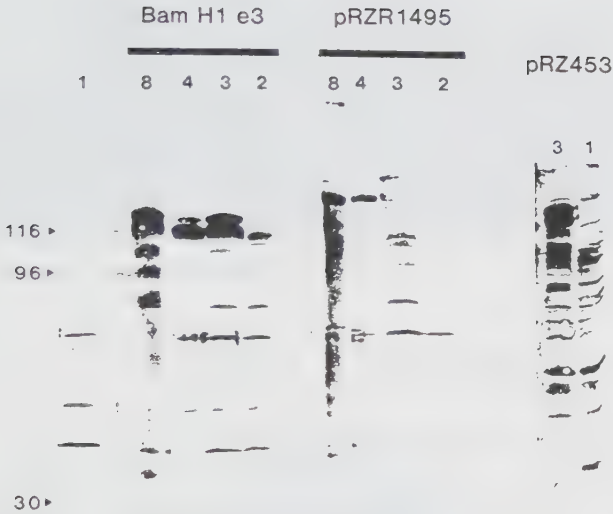


Abb29

Expression der Leserahmen in Bakterien und Reinigung der Fusionsproteine - Western Blot
 Lysierte Bakterien, die nach Induktion die Proteine der jeweiligen Expressionsplasmide produzierten, sowie Proben einzelner Reinigungsschritte wurden in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, anschließend auf Nitrocellulose geblotted und mit einem Pool von Patientenserum inkubiert. Legende siehe Abb.28

Diese Bande ist jeweils leicht größer als die unfusionierte β -Galaktosidase.

Bei der Reinigung der Proteine wurden Proben der einzelnen Schritte jeweils durch Coomassie-Färbung (Abb.28) und durch Western Blots (Abb.29) analysiert. Der größte Teil aller bakteriellen Proteine ist nach dem Aufschluß der Bakterien in 3% Triton löslich. Aus dem unlöslichen Pellet können durch 8M Harnstoff vor allem die Fusionsproteine und zwei zelluläre Proteine von etwa 40kd gelöst werden. Diese beiden fallen nach Dialyse gegen 3M Harnstoff aus, während die Fusionsproteine noch in Lösung bleiben und erst nach Dialyse gegen PBS ausfallen. Durch diese einfache und schnelle Reinigung gelang es, die Fusionsproteine mit großer Ausbeute relativ sauber zu isolieren.

5.6. Identifizierung der Proteine in den Zellen

5.6.1. Immunpräzipitation

Die Seren der mit den Fusionsproteinen immunisierten Kaninchen wurden verwendet, um jeweils aus in vitro Translation und in vivo markierten Zellen durch Immunpräzipitation die in diesen Leserahmen kodierenden Proteine zu identifizieren.

Das Serum gegen das exprimierte pRZR1495 präzipitiert aus den in vitro Translationen jeweils die durch hybrid selected Translation kartierten Proteine von 92kd aus induzierten P3HR1-, 94kd aus induzierten B95-8- und 96kd aus induzierten Raji-Zellen (Abb.30). Nach in vivo Markierung wird ein 96kd-Protein aus induzierten Raji-, ein 95kd-Protein aus induzierten B95-8- und eine 94kd/95kd-Doppelbande aus induzierten P3HR1-Zellen präzipitiert. Aus superinfizierten Raji-Zellen kann ein 96kd-Protein präzipitiert werden. Das Protein wird also posttranslational modifiziert. Ähnlich wie im Falle des 47kd in vitro translatierten, 54kd in vivo markierten Proteins treten wahrscheinlich Zwischenstufen der Modifikation auf, wodurch jeweils mehrere Banden präzipitiert werden. Eine Bande von ca. 60kd, die spezifisch präzipitiert wird, stellt eventuell ein Abbauprodukt dar. Inwieweit das

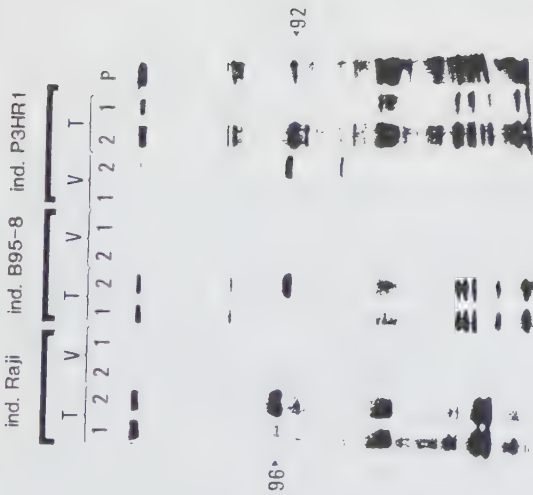
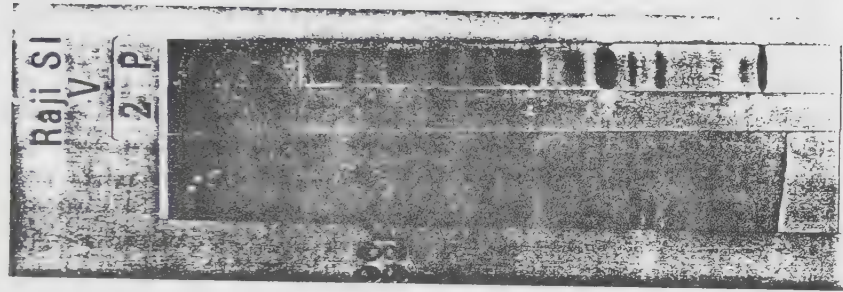


Abb.30

Immunpräzipitation mit dem Serum gegen das in Bakterien exprimierte Protein aus dem BRLF1 Leserahmen

(T): in vitro Translation (V): in vivo Markierung

(1): Präserum des Kaninchens vor der Immunisierung

(2): Immunsrum des Kaninchens nach der Immunisierung

(P): Pool von Patientenserum

Neben der Immunpräzipitation eines Extraktes aus superinfizierten Raji-Zellen sind als Gr80enmarker nochmals Immunpräzipitationen von in vitro Translationen von RNA aus induzierten Raji- und P3HR1-Zellen aufgetrennt.

Auftreten von verkürzten Produkten in vivo und in vitro in Zusammenhang steht ist unklar. Dieses 92kd/94kd/96kd-Protein wurde in früheren Arbeiten wahrscheinlich nicht charakterisiert, da es ohne Immunpräzipitation von massiven zellulären Banden in diesem Bereich verdeckt wird, und auch die Immunpräzipitation erschwert ist, da nur wenige der untersuchten Patientenserum Antikörper gegen dieses Protein aufweisen. Auch in den positiven Seren erreicht der Antikörpertiter bei weitem nicht den Wert des Kaninchenserums (gemessen durch die Intensität der Bande nach Immunpräzipitation), und schließlich ist das Protein in vitro besser markierbar als in vivo.

Das Serum gegen das exprimierte pR2453 erkennt aus der in vitro Translation die in der Region kartierten Proteine 39kd/40kd aus induzierten P3HR1- und 37,5kd/38kd aus induzierten B95-8- und Raji-Zellen (Abb.31). Aus den in vivo markierten Zellen kann jeweils ein Protein von 35kd präzipitiert werden, wobei das Protein aus Raji-Zellen etwas größer zu sein scheint. Vom primären Translationsprodukt, das ebenfalls jeweils noch in der in vivo Markierung zu sehen ist, wird also ein Teil abgespalten. Der abgespaltene Teil des Proteins scheint in P3HR1-Zellen größer als in den anderen Zelllinien zu sein, wodurch sich die Molekulargewichtsunterschiede bei den prozessierten Proteinen aufheben. Das Auftreten von Doppelbanden in der in vitro Translation erklärt sich vielleicht daraus, daß bereits in den Translationsansätzen das Processing beginnt. Aus superinfizierten Raji-Zellen wird neben einigen Zwischenformen und dem prozessierten Protein ein primäres Translationsprodukt von 40kd präzipitiert. Das Protein wird also wahrscheinlich vom Genom des infizierenden P3HR1-Virus exprimiert.

Mit dem Serum gegen das exprimierte pRe3-521 (BamH1 e3) konnte aus der in vitro Translation kein Protein immunpräzipitiert werden. Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse, daß das Protein vom Leserahmen im BamH1 e3 Fragment nicht durch in vitro Translation identifizierbar ist. Nach in vivo Markierung kann aus induzierten P3HR1-, induzierten B95-8- und superinfizierten Raji-Zellen ein Protein von 140kd präzipitiert werden (Abb.32). In induzierten Raji-Zellen fehlt das Protein, da der Leserahmen deletiert ist. In den superinfizierten Raji-Zellen wird

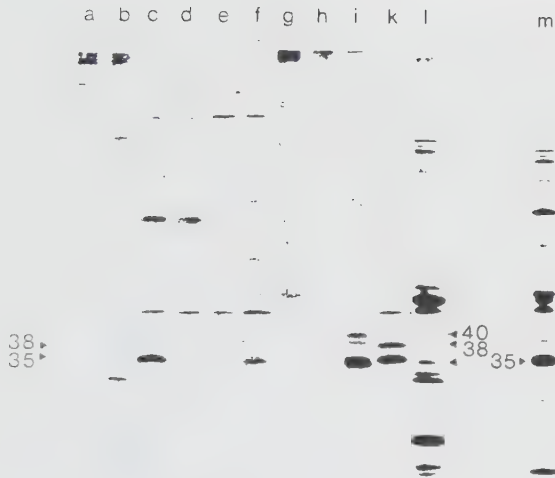


Abb.31

Immunpräzipitation mit dem Serum gegen das in Bakterien exprimierte Protein aus dem B2Lf1 Leserahmen

(a): in vitro Translation von RNA aus induzierten B95-8-Zellen immunpräzipitiert mit dem Präserum

(b): in vitro Translation von RNA aus induzierten B95-8-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immunserum

(c): in vivo Markierung von induzierten B95-8-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immunserum

(d): in vivo Markierung von induzierten B95-8-Zellen immunpräzipitiert mit dem Präserum

(e): in vivo Markierung von induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit dem Präserum

(f): in vivo Markierung von induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immunserum

(g): in vitro Translation von RNA aus induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immunserum

(h): in vitro Translation von RNA aus induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit dem Präserum

(i): in vivo Markierung von superinfizierten Raji-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immunserum

(k): in vivo Markierung von induzierten Raji-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immunserum

(l): in vitro Translation von RNA aus induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit einem Pool von Patientenseren

(m): in vivo Markierung von superinfizierten Raji-Zellen immunpräzipitiert mit einem Pool von Patientenseren

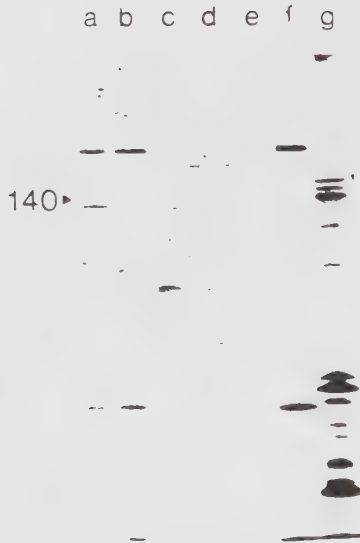


Abb.32

Immunpräzipitation mit dem Serum gegen das in Bakterien exprimierte Protein aus dem B2LF2 Leserahmen

- (a): in vivo Markierung von induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit dem Präserum
- (b): in vivo Markierung von induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immuserum
- (c): in vivo Markierung von induzierten B95-8-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immuserum
- (d): in vivo Markierung von induzierten B95-8-Zellen immunpräzipitiert mit dem Präserum
- (e): in vivo Markierung von superinfizierten Raji-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immuserum
- (f): in vivo Markierung von Raji-Zellen immunpräzipitiert mit dem Immuserum
- (g): in vitro Translation von RNA aus induzierten P3HR1-Zellen immunpräzipitiert mit einem Pool von Patientenseren

dieses Protein also eindeutig vom infizierenden P3HR1-Genom exprimiert.

5.6.2. Immunfluoreszenz

Mit den Seren der immunisierten Kaninchen wurde weiterhin versucht, durch Immunfluoreszenz Hinweise über die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Proteine zu erhalten. Da schon die vor der Immunisierung den Kaninchen entnommenen negativen Kontrollseren starke Fluoreszenz sowohl mit P3HR1- als auch mit BJA-Zellen zeigten, wurden die Immunglobuline der Seren durch Ammonsulfatfällung angereichert, um unspezifische Reaktionen der Serumproteine zu reduzieren. Dennoch verblieb ein hoher Anteil an unspezifischer Fluoreszenz. Lediglich mit den Immunglobulinen aus dem Serum gegen das exprimierte pRe3-521 (BamH1 e3) konnte eine zusätzliche spezifische Fluoreszenz entdeckt werden. Präserum und Immunserum zeigten mit BJA- und P3HR1-Zellen eine nukleäre Fluoreszenz. Nur das Immunserum zeigte nur mit P3HR1-Zellen eine Fluoreszenz der Zytoplasmamembran (Abb.33). Das Antigen scheint sich teilweise von der Innenseite der Membran aus etwas ins Zytoplasma zu erstrecken, genaue Aussagen darüber sind jedoch nicht möglich, da es sich auch um ein Artefakt der Fixierung handeln kann. Mit Aceton fixierte Zellen zeigten die Fluoreszenz am deutlichsten, jedoch auch nach Verwendung anderer Fixierungsmittel war die Membranfluoreszenz sichtbar.



Abb. 33a

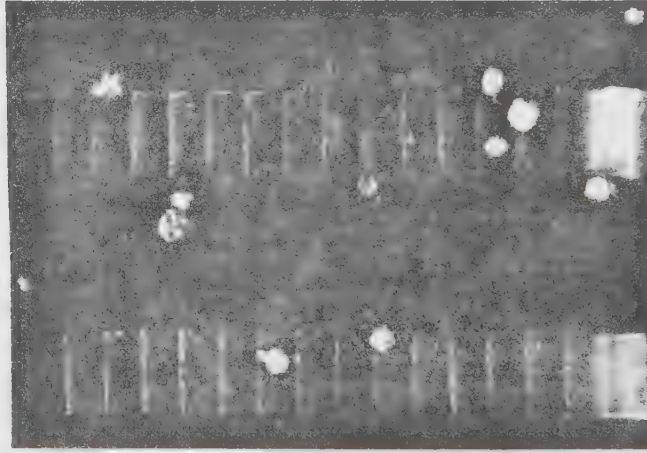


Abb. 33b



Abb. 33c

Abb. 33
 Immunfluoreszenz mit dem Serum gegen das in Bakterien exprimierte Protein aus dem B2LF2 Leserahmen
 a: induzierte P3HR1-Zellen mit dem Präserum
 b: BJA-Zellen mit dem Immuneserum
 c: induzierte P3HR1-Zellen mit dem Immuneserum

D. Diskussion

1. Allgemeines

Die Expression des Epstein-Barr Virus wird auf mehreren Ebenen reguliert. In der Zellkultur haben infizierte Lymphozyten zwar meist prinzipiell die Fähigkeit, Viruspartikel zu produzieren, einige Zelllinien produzieren Proteine des lytischen Zyklus jedoch nur nach Induktion und dies in sehr unterschiedlichem Ausmaß, andere produzieren diese zu einem geringen Teil spontan. Im lytischen Zyklus wiederum ist die Expression der viralen Proteine vielschichtig reguliert. Im Wirtsorganismus ist die Expression wahrscheinlich unter zusätzlicher Kontrolle durch das Immunsystem. Explantate von Burkitt Lymphomen oder Nasopharynx-Karzinomen sind direkt nach der Entnahme frei von Viruspartikeln, innerhalb von 36h sind solche jedoch elektronenoptisch nachweisbar. Es kann nicht mit letzter Sicherheit entschieden werden, auf welcher Ebene die Virusproduktion im Körper unterdrückt wird, ob über die Kontrolle der Genexpression oder über frühzeitige Eliminierung induzierter Zellen. Aus der Histologie ist kein Hinweis auf massive Zelldegradierungen zu erhalten, daher ist eine weitgehende Kontrolle der Virusproduktion auf der Ebene der Genexpression wahrscheinlich. In der Ohrspeicheldrüse findet zwar ständig Virusproduktion statt, jedoch nur in beschränktem Ausmaß, so daß es nicht zur Zerstörung von Zellen in größeren Mengen kommt. In den latent infizierten B-Lymphozyten im immunkompetenten Wirt ist die Expression des lytischen Zyklus vollständig reprimiert, da andernfalls frühe Antigene freigesetzt würden, und Antikörper dagegen nachweisbar sein müßten.

Zur Aufklärung der Regulation ist die Kartierung der Virus-Proteine auf dem Genom notwendig, um die Expression vermuteter regulatorischer Genprodukte gezielt untersuchen zu können. In den verschiedenen Systemen können möglicherweise entscheidende Unterschiede in der Transkription oder Translation dieser Gene gefunden werden. Durch das Einbringen und die Expression einzelner EBV-Gene, oder mehrerer EBV-Gene in Kombination, in Eukaryonten-Zellen kann die Funktion dieser

Proteine aufgeklärt werden. Auf diese Weise ist es vielleicht auch möglich, die für die Transformation oder für die Zellfusion verantwortlichen Proteine zu identifizieren.

Die dominierenden Proteine des lytischen Zyklus sollten auch auf dem Genom lokalisiert werden, da, nach Expression in geeigneten Systemen, deren Verwendung als Antigen in der Diagnostik erhebliche Vorteile verspricht, und einige als potentieller Impfstoff-eventuell von Nutzen wären.

Für all diese Aufgaben ist es notwendig, die Kartierung bis zur Ebene der Leserahmen durchzuführen. Nach der Sequenzierung der EBV-DNA (B95-8) mit 172 282 Nukleotiden wurden durch Computerprogramme 84 offene Leserahmen ermittelt (Baer et al 1984). Aus Proteinuntersuchungen sind bisher etwa 40 EBV-Proteine bekannt. Da nach den unter anderem in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen Splicing keine dominierende Rolle bei der Expression des Epstein-Barr Virus spielt, existieren mit Sicherheit Leserahmen, deren Expression bisher nicht erfaßt werden konnte. Diese kodieren eventuell für regulatorische Proteine, die nur in verschwindend geringem Ausmaß produziert werden, und gegen die in den Patientenseren keine Antikörper vorhanden sind, oder für Proteine, die nicht in den zur Verfügung stehenden lymphoblastoiden Zellen exprimiert werden, da sie nur unter speziellen Bedingungen in eventuell anderen Zelltypen im Körper Funktionen ausüben. Nachdem solche Gene durch Ausschlußverfahren identifiziert sind, indem die bekannten Proteine lokalisiert werden, können sie beispielsweise durch spezifische Hybridisierungsproben, durch monospezifische Seren, die mit synthetischen Peptiden oder durch Expression in Bakterien gewonnen werden, oder durch gezielte Expression in unterschiedlichen Eukaryonten-Zellen untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden immediate early, frühe und späte Proteine kartiert, wobei die kodierenden Sequenzen in den meisten Fällen auf einen einzelnen Leserahmen beschränkt werden konnten. Diese Ergebnisse sind im Einzelnen am Schluß (D.6.) zusammen mit einer Diskussion aller bekannten Daten zur Expression einzelner Teilbereiche der EBV-DNA zusammengefaßt.

Um bei der Kartierung viraler Proteine Kreuzhybridisierungen mit

zellulärer mRNA ausschließen zu können und um eventuelle verwandte zelluläre Proteine zu identifizieren, wurde die hybrid selected Translation auch mit RNA aus EBV-negativen lymphoblastoiden Zellen (BJA) durchgeführt. Dabei wurde auf der Ebene der translatierbaren mRNA eine Kreuzhybridisierung nur mit dem BamH1 K Fragment festgestellt.

2. Translation eines kreuzhybridisierenden zellulären Transkripts

Die mit dem BamH1 K Fragment hybridisierenden zellulären mRNAs konnten in Proteine von 84kd und 92kd in vitro translatiert werden. Diese Proteine haben eventuell ähnliche Funktionen wie das von der kreuzhybridisierenden EBV-DNA translatierte EBNA 1-Protein. Im BamH1 K Fragment befindet sich ein Repeat, der aus Wiederholungen der Triplets GGG, GCA und GGA aufgebaut ist (Heller et al 1982a) und als Teil des EBNA 1-Proteins transkribiert und translatiert wird, wobei der Repeat als Abfolge von Glycin und Alanin expriert wird (Hennessy et al 1983a, 1983b). Dieser Repeat hybridisiert mit zellulärer DNA von Mensch und Maus, wobei mindestens 60 homologe Sequenzen im menschlichen Genom verteilt sind (Heller et al 1982b). Einige dieser Kopien wurden aus einer Genbank isoliert und sequenziert (Heller et al 1985). Dabei zeigte sich, daß die zellulären Homologen aus Wiederholungen des Triplets GGA bestenen, und zumindest eines teilweise in Glycin und Alanin translatiert werden kann, während die anderen größere Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung aufweisen. Diese zellulären Sequenzen finden sich wahrscheinlich in allen Säuger-DNAs (Heller et al 1985). Zumindest eine dieser zellulären Repeat-Strukturen scheint in eine translatierbare mRNA transkribiert zu werden, da in dieser Arbeit mit dem BamH1 K Fragment zelluläre mRNA unter stringenten Bedingungen durch Hybridisierung isoliert werden konnte. Bedingt durch den hohen GC-Gehalt des Repeats (74%) müssen Ergebnisse von Hybridisierungen vorsichtig interpretiert werden. Die Fragmente, die den NotI bzw. PstI Repeat mit je 84% GC enthalten, sowie das BamH1 W Fragment mit 67% GC zeigen jedoch unter den gewählten Bedingungen keinerlei Hybridisierung mit zellulärer mRNA.

Die Tatsache, daß Antikörper gegen synthetische Peptide aus der

Glycin-Alanin-Region des EBNA 1 (Dillner et al 1984), ein Monoklonaler Antikörper gegen dieses Protein (Luka et al 1984) sowie Antikörper gegen den in Bakterien als Fusionsprotein exprimierten Glycin-Alanin Repeat des EBNA 1 (Luka et al 1984) jeweils auch zelluläre Proteine erkennen, ist ein weiterer Hinweis, daß zelluläre Repeat-Strukturen exprimiert werden und zwar ebenfalls in eine Glycin-Alanin-Domäne. Bei den zellulären Kopien, die nicht in eine Glycin-Alanin-Abfolge translatiert werden können, handelt es sich möglicherweise um Pseudogen-artige Elemente. Auch andere repetitive zelluläre Sequenzen (z.B. Alu- oder Copia-Elemente) werden transkribiert und diese RNAs können teilweise in vitro translatiert werden (Jelinek 1982).

Ähnliche Kreuzhybridisierungen treten möglicherweise auch bei Herpes Simplex Virus auf. Es wurde berichtet, daß Restriktionsfragmente von Herpes Simplex Virus Typ 2 mit menschlicher RNA unter stringenten Bedingungen hybridisieren (Maitland et al 1981), und zwar Fragmente, die die Repeat-Elemente an den Enden der DNA beinhalten. Diese Endfragmente weisen Homologien mit repetitiven, zellulären Sequenzen auf (Peden et al 1982).

Die Kreuzhybridisierung anderer EBV-DNA Fragmente mit zellulärer DNA und RNA wurde ebenfalls beobachtet (Peden et al 1982, Arrand et al 1983), jedoch nur die des BamHI K Fragments wurde einheitlich festgestellt. Die evolutionären und funktionellen Zusammenhänge zwischen den zellulären Repeat-Elementen und dem EBNA 1-Repeat auf DNA- und Protein-Ebene verbleiben zur Klärung in zukünftigen Arbeiten.

3. Kartierung von immediate early Proteinen

Immediate early Proteine sind per Definition Proteine, deren mRNA ohne vorherige Synthese von Virusproteinen transkribiert wird. Die in dieser Arbeit identifizierten immediate early Proteine sind daher im strengen Sinne keine immediate early Proteine, da in den induzierten und mit Cycloheximid gehemmten Raji-Zellen bereits die für das latente Stadium charakteristischen EBV-Proteine vorhanden sind. Da jedoch für Epstein-Barr Virus kein lytisches Zellsystem existiert, ist man zur Untersuchung der immediate early Genexpression auf latent infizierte

Zellen angewiesen. Die so identifizierten immediate early Proteine stellen auf jeden Fall die Gene dar, die beim Übergang vom latenten in das lytische Stadium als erste exprimiert werden und sind wahrscheinlich zumindest teilweise mit den Genen identisch, die bei einer Primärinfektion im Körper in den permissiven Zellen als erste transkribiert werden. Immediate early Proteine wären somit die Proteine, die generell nach der Einleitung eines lytischen Zyklus als unmittelbar erste transkribiert werden.

Auch bei der Superinfektion von Raji-Zellen, die von anderen Autoren zur Untersuchung der immediate early Gene verwendet worden ist, befinden sich bereits die EBV-Proteine des latenten Stadiums in den Zellen. Acht immediate early Proteine wurden nach Superinfektion von Raji-Zellen und gleichzeitiger Hemmung mit Cycloheximid durch in vivo Markierung identifiziert - 48kd, 49kd, 54kd, 63kd, 102kd, 105kd, 110kd und 120kd (Bayliss und Wolf 1981b). Das 54kd-Protein, das aus einem 47kd großen Precursor prozessiert wird, wurde in dieser Arbeit im BamHI M Fragment im BHRF1 Leserahmen kartiert und in chemisch induzierten Raji-Zellen als immediate early Protein identifiziert. Das BamHI M Fragment wird in superinfizierten, mit Cycloheximid gehemmten Zellen in hohem Ausmaß transkribiert (Nonoyama et al 1983). Die beobachteten immediate early Proteine 48kd und 49kd sind eventuell nur teilweise prozessierte Formen des 54kd-Proteins, die, wie erwähnt, in den Zellen vorliegen, wie durch Immunpräzipitation mit dem Monoklonalen Antikörper gegen das 54kd-Protein nachgewiesen wurde.

Als weiteres immediate early Protein in chemisch induzierten Raji-Zellen wurde das 18kd-Protein vom BHRF1 Leserahmen an der Grenze der BamHI Fragmente H und F identifiziert. Proteine dieser Größe wurden von Bayliss und Wolf nicht analysiert. Nonoyama et al fanden außer im BamHI M Fragment nur im BamHI F Fragment eine schwache Transkription in Cycloheximid-gehemmten superinfizierten Raji-Zellen, die sie jedoch als Transformationsspezifisch erklärten. Das 18kd immediate early Protein kann jedoch für diese schwache Transkription des BamHI F Fragmentes verantwortlich sein. Die von Nonoyama et al verwendete Methode (Dot-Blot-Hybridisierung, Hybridisierung auf Nitrocellulose getropfter Nukleinsäure) ist möglicherweise zu unempfindlich, um die nur schwach

transkribierten immediate early Gene zu entdecken. Ein Hinweis dafür ist, daß auch nicht alle frühen Gene in superinfizierten Raji-Zellen, die mit PAA gehemmt wurden, identifiziert wurden.

Zwei weitere Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit als möglicherweise immediate early Proteine identifiziert. Ein Protein von 105kd im Bereich der Deletion in B95-8-Zellen, das mit einem 105kd immediate early Protein nach in vivo Markierung (Bayliss und Wolf 1981b) identisch sein könnte, und ein in verschiedenen Zelllinien im Molekulargewicht leicht unterschiedliches Protein von 94kd aus dem BRLF1 Leserahmen, das, wie erwähnt, nach in vivo Markierung wahrscheinlich von zellulären Banden verdeckt wird. Aufgrund der geringen Transkription der immediate early Gene und der geringen Anzahl der Raji-Zellen, die sich nach Induktion und Cycloheximid-Hemmung im lytischen Zyklus befinden, konnten nach hybrid selected Translation (im Falle des 105kd-Proteins ohne Immunpräzipitation) beide Proteine nur andeutungsweise identifiziert werden. Die Immunpräzipitation des 94kd-Proteins (96kd in den Raji-Zellen) konnte durch Proteinextrakte aus Zellen, in denen nur immediate early virale neben zellulären mRNAs translatiert worden waren, blockiert werden (siehe Abb.12). Dies ist ein weiterer Hinweis, daß es sich bei dem 94kd-Protein um ein immediate early Protein handelt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß das bei diesem Versuch identifizierte Protein ein zelluläres Schockprotein ist, da auch solche in dem Extrakt vorliegen.

Die weiteren nach in vivo Markierung identifizierten immediate early Proteine (Bayliss und Wolf 1981b) konnten nicht auf dem Genom lokalisiert werden. Möglicherweise sind einige von ihnen zelluläre Schock-Proteine, die infolge der Superinfektion und/oder der Cycloheximid-Behandlung verstärkt oder neu exprimiert werden. Ein Hinweis für die Existenz solcher ist, daß die Infektion von Zellen mit Herpes Simplex Virus die Akkumulation von Schock-Proteinen verursacht (LaThangue et al 1984). Außerdem werden in in vitro Translationen von RNA aus Affennieren-Zellen, die mit Cycloheximid behandelt wurden, gegenüber RNA aus unbehandelten Zellen ebenfalls einige zelluläre Proteine verstärkt translatiert (Hell persönliche Mitteilung). Es ist jedoch auch durchaus möglich, daß in chemisch induzierten Raji-Zellen,

die zum vollständigen lytischen Zyklus nicht in der Lage sind, nur eine verminderte Anzahl von immediate early Genen im Vergleich zu superinfizierten Raji-Zellen exprimiert wird.

4. Kartierung von Proteinen auf dem Genom

Parallel zu dieser Arbeit wurden von zwei weiteren Gruppen Kartierungen des EBV-Genoms durch hybrid selected Translation durchgeführt (Hummel und Kieff 1982b, Cohen L.K. et al 1984). Diese Ergebnisse sind der Zuordnung der Proteine zu den BamH1-Fragmenten aus dieser Arbeit in einer Tabelle gegenübergestellt (siehe nächste Seite).

In der ersten Arbeit (Hummel und Kieff 1982a) wurden teilweise Klone, die sehr große Bereiche der DNA umspannen, benutzt, wodurch die Kartierung ungenau und ein Vergleich mit anderen Daten schwierig ist. Viele der mit RNA aus B95-8-Zellen kartierten Proteine entsprechen in dieser Arbeit identifizierten. Einige Unterschiede sind nur schwer erklärbar und beruhen eventuell auf Fehlern in der in vitro Translation (verkürzte Produkte), mangelnder Sensitivität oder stammspezifischen Variationen. Den Leserahmen BSLF1 und BMLF1 konnten beispielsweise in dieser Arbeit mehrere Proteine zugeordnet werden, jedoch einige nur mit RNA aus induzierten P3HR1-Zellen. Entsprechende Proteine fehlen bei Hummel und Kieff, was teilweise jedoch durch die Verwendung von RNA aus B95-8-Zellen bedingt ist. Das 94kd-Protein in den BamH1-Fragmenten Z und R wurde von Hummel und Kieff nicht identifiziert, dessen Kartierung ist jedoch durch die Expression in Bakterien abgesichert. Im BamH1 L Fragment wurde von Hummel und Kieff ein 135kd-Protein kartiert, das später durch ein spezifisches Serum als Precursor für das gp350 identifiziert wurde (Hummel et al 1984). Da B95-8-Zellen vorwiegend das gp350 produzieren, während P3HR1-Zellen in erster Linie das gp250 synthetisieren (Edson und Thorley-Lawson 1981), ließ bereits die Kartierung eines 110kd-Proteins mit P3HR1-RNA in diesem Fragment vermuten, daß es sich dabei um den Precursor des gp250 handelt, was auch später durch die Verwendung eines monospezifischen Serums bestätigt wurde.

Von der zweiten Gruppe (Cohen L.K. et al 1984) wurde ebenfalls RNA aus

Bamit	eigene Ergebnisse RaJ1 Ind./P3HRI	Hummel und Kleff B95-8	Cohen, L.K. et al P3HRI
C	143	145	145;76;75
W	-	n.t.	-
Y	-	n.t.	-
H	18	18	14
F	47;41;40;39;5;35;18	39;38;(34);28	32;31;26;22;14
Q	-	-	-
U	-	n.t.	-
P	-	n.t.	-
O	90;48;40	n.t.	-
a	90;48;40;36	85;58	74;68;67;61;57;55;36;32
H	70;65;47;37;5;36;34;31;30	85;58;51;41;36	74;68;67;61;57;55;36;32;28;25;21;16
S	70;65;37;5;34;31;30	47;44;36	58;52;44;43;40;28;26
L	110;33;23;19	-	58;52;25;20
E	-	135;94;32;22;18;15	125;87;78;(66);60;(56);(52);36;34;32;29;25;24;20;15;14;12
e1,2,3	-	-	105;100;79;(69);(68);(66);64;60;54;50;42;39;36;31;29
Z	96/92;83;78;81;75;48;38;40;37;5/39	-	-
R	96/92;83;78;81;75;80;48	-	77;32;31
K	80;48;44;29	- 80;78;68;63;40;35;33	77;60;43;34;33;32;27
B	84;48;45	-	60;42;36;35;25;23;19;18;16;15
G	48;45;35	50;46;34;(22);(18)	70;44;43;24
D	150;40;35;31	-	29;24
C	150	- 220;150;52;42;36;32;31	135;115;100;24
b	-	n.t.	n.t.
T	73;69	-	-
X	73;69	73	-
V	140;64;46;35	-	72;66
d	110;49	70;47;(41);(34);20	100;72;66;40;36;31;17;16;14
I	140;110;64;49;46;35	-	n.t.
B'W'I'	140;110;64;49;46;35	-	-
A	138;110;96;43	135;90;42	135;105;100;75;63;58;52;40;35;33;32

Tabelle 1: Vergleich der Ergebnisse der hybrid selected Translation

P3HR1-Zellen verwendet. Sehr viele der kartierten Proteine sind wahrscheinlich verkürzte Produkte, da jeweils in Fragmenten, in denen ein massiv exprimiertes Protein existiert, eine ganze Reihe von kleineren, schwächeren Banden gefunden wird. Nach den Sequenzdaten und der in dieser Arbeit erfolgten Zuordnung von Proteinen zu einzelnen Leserahmen besteht keine Veranlassung, die in einigen Fragmenten kartierten zahlreichen Proteine anders zu erklären. Die zwei größten Proteine (150kd, 143kd) wurden von dieser Gruppe falsch zugeordnet, wahrscheinlich infolge einer mangelhaften Bestimmung des Molekulargewichts, da auch im Bereich 100kd bis 50kd die Proteine nach Translation von Gesamt-RNA und nach Translation von hybrid selected RNA teilweise nicht in Übereinstimmung zu bringen sind. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den anderen Daten ist aus diesen Gründen wiederum nur schwer möglich. Auch von dieser Gruppe konnten in der in B95-8-DNA deletierten Region keine Proteine identifiziert werden. Sogar die vollständige B'W'I' Region war negativ. Ein dem 49kd-Protein vom Leserahmen BVRF2 entsprechendes Protein wurde zwar dem BamH1 d Fragment, nicht aber dem BamH1 B' Fragment zugeordnet, obwohl der Leserahmen sich in dieses Fragment erstreckt und das BamH1 I Fragment dieses Protein eindeutig identifiziert.

Durch die in dieser Arbeit erfolgten Kartierung über die Ebene der BamH1 Fragmente hinaus konnten viele Proteine definitiv einzelnen Leserahmen zugeordnet werden. Dadurch war es auch möglich, verkürzte Proteine, die durch hybrid selected Translation teilweise entstehen, als solche zu identifizieren. Des weiteren wurde in dieser Arbeit begonnen, die durch in vivo Markierung charakterisierten EBV-Proteine den nach in vitro Translation erhaltenen über den bloßen Vergleich der Molekulargewichte hinaus zuzuordnen.

Durch die Verwendung von RNA aus induzierten Raji-Zellen war es möglich, eine große Anzahl von Proteinen als früh zu klassifizieren. Dieses System erlaubt eine sichere Identifizierung des weit überwiegenden Teils der frühen Proteine. Die von Hummel und Kieff, Cohen L.K. et al und der Arbeitsgruppe in Cambridge verwendete Methode, frühe mRNAs durch Hemmung der produzierenden Zelllinien B95-8 und P3HR1 mit PAA zu erhalten, hat den Nachteil, daß die Präparationen nicht

völlig frei von später mRNA sind, und frühe mRNAs nur mehr oder weniger angereichert werden können. Die Proteine 23kd und 19kd im BamH1 L Fragment werden beispielsweise in induzierten Raji-Zellen nur in sehr reduziertem Maß, in induzierten P3HR1- und B95-8-Zellen dagegen massiv exprimiert. Dies scheint die Verhältnisse vor und nach Replikation der DNA in der Zelle wiederzuspiegeln, da die entsprechenden Promotoren als spät eingestuft wurden (Biggin et al 1984). Dies erklärt sich daraus, daß die geringe Transkription früh, das heißt unter PAA-Hemmung, von der Grundsynthese, die in mit PAA gehemmten B95-8-Zellen noch vorliegt, verdeckt wird, während ohne PAA-Hemmung eine deutliche Steigerung der Transkription zu beobachten ist. Diese Proteine entsprechen somit Proteinen ähnlicher Zeitkinetik bei Herpes Simplex Virus, die Beta-Gamma-Proteine genannt werden (Wagner 1984).

Eine Zusammenfassung der verfügbaren Daten über die exprimierten Proteine sowie deren Korrelation mit den offenen Leserahmen erfolgt im Abschnitt D.6.

5. Expressionsmodell der BamH1 Z Region

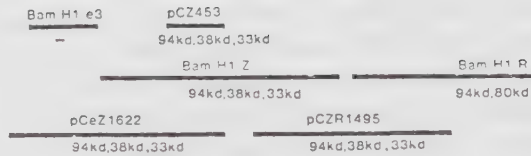
Ein Bereich der EBV-DNA, die BamH1 Z Region (101kbp - 105kbp), fiel durch ausgeprägte Heterogenität in verschiedenen Stämmen und sehr komplexe Expression auf. Einem der Leserahmen aus der Region, der in Raji-Zellen deletiert ist und am 5'-Ende für ein potentiell Signalpeptid kodiert, konnte durch hybrid selected Translation kein Protein zugeordnet werden. Zwei andere Leserahmen kodieren für Proteine, die unterschiedliche Molekulargewichte in den einzelnen Zelllinien aufwiesen. Die entsprechenden Proteine nach in vivo Markierung konnten nicht identifiziert werden. Außerdem sind alle drei Leserahmen in defekten DNA-Molekülen des P3HR1-Stamms (het-DNA) enthalten, die mit der Induktion des lytischen Zyklus in Zusammenhang stehen. Durch die Expression der drei offenen Leserahmen in Bakterien, die Immunisierung von Kaninchen mit diesen Proteinen und die Immunpräzipitation mit den so gewonnenen Antiseren, konnten die in der Region kodierenden Proteine eindeutig bestimmt werden. Northern Blots und hybrid selected Translation erbrachten Hinweise zur Transkription

dieser Gene, so daß ein detailliertes Modell der Expression dieser Region aufgestellt werden kann (Abb.34).

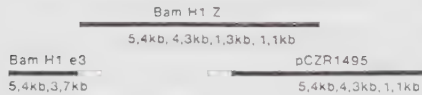
Im BRLF1 Leserahmen kodiert ein Protein von 94kd, das in induzierten B95-8-, P3HR1- und Raji-Zellen sowohl nach in vitro Translation als auch nach in vivo Markierung ein leicht unterschiedliches Molekulargewicht aufweist. Eine Insertion von etwa 150 Nukleotiden (Bornkamm et al 1980) in dieser DNA-Region beim B95-8-Stamm (Raji-DNA wurde nicht untersucht) steht eventuell damit in Zusammenhang. Das Protein ist möglicherweise ein immediate early Protein und posttranslational modifiziert, da das Molekulargewicht nach in vivo Markierung im Vergleich zur in vitro Translation etwas erhöht ist. Das Protein wird von einer 4,3kbp mRNA translatiert, da diese als einzige dieser Region noch mit dem Plasmid pCZR1495, jedoch nicht mehr mit dem BamH1 e3 Fragment hybridisiert. Das 3'-Ende der mRNA befindet sich innerhalb des Plasmids pCZ453 oder zwischen den Plasmiden pCZ453 und BamH1 e3, da mit pCZ453 das p94 noch nach hybrid selected Translation erhalten wurde. In dieser Region liegen zwei Polyadenylierungsstellen, nach denen die mRNA wahrscheinlich stoppt. Unter Berücksichtigung der Länge der mRNA liegt der Start der Transkription bei einem Promotor bei 106kbp, der aus der Sequenz ermittelt wurde (Baer et al 1984). Die mRNA ist in induzierten Raji-Zellen etwas größer, in Übereinstimmung mit dem leicht größeren Protein in diesen Zellen. Zwei Proteine im Bereich von 80kd sind verkürzte Produkte des p94 und erscheinen reproduzierbar nach hybrid selected Translation. Inwieweit diese Proteine mit verkürzten Produkten, die auch nach in vivo Markierung auftreten, in Zusammenhang stehen, ist unklar.

Der Leserahmen BZLF1 kodiert für ein frühes Protein von 35kd. Vom primären Translationsprodukt von 38kd (40kd in P3HR1-Zellen) wird in der Zelle ein Peptid abgespalten, wodurch sich das endgültige Molekulargewicht von 35kd ergibt. Das Protein erscheint in der in vitro Translation immer als Doppelbande. Eine mögliche Ursache dafür ist, daß bereits in der in vitro Translation das Processing des Proteins beginnt. Das Molekulargewicht des prozessierten Proteins scheint in induzierten Raji-Zellen etwas größer zu sein, dagegen ist es in P3HR1-Zellen, die ein vergrößertes primäres Translationsprodukt bilden,

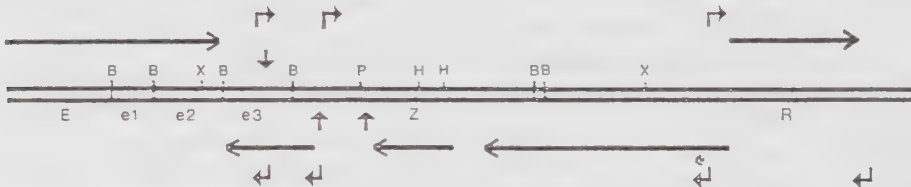
► Hybrid Selected Translation



► Northern Blots



► Sequenzanalyse (R. Baer et al)



► Expressionsmodell

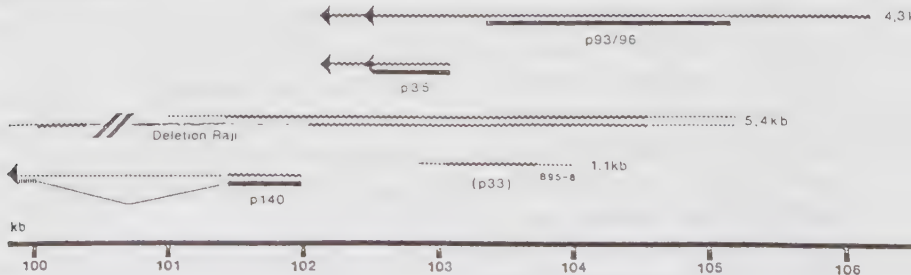


Abb.34

Expression der BamH1 Z Region

In Zusammenfassung aller Ergebnisse der hybrid selected Translation, der Northern Blots und der Immunpräzipitation mit den Seren gegen die exprimierten Protein wurde mit Hilfe der Sequenzdaten ein Modell der Expression dieser Region erstellt. Erklärungen im Text. Legende siehe Abb.35

nicht abweichend. Die zusätzlichen Sequenzen des P3HR1-Proteins werden also mit abgespalten. Durch die Deletion in Raji-Zellen ist die Expression dieses Proteins nicht berührt. Den Daten der hybrid selected Translation zufolge kodiert die mRNA für das 35/38kd-Protein vollständig innerhalb des BamHI Z Fragments, wobei das Plasmid pCZR1495 ebenfalls noch mit dieser mRNA hybridisiert. Ein Promotor mit einem kleinen offenen Leserahmen bei 105kbp, der eventuell an die mRNA gespliced wird, kann trotzdem der Start der Transkription sein, da dieses Stück zu kurz ist, um unter den stringenten Bedingungen ein positives Hybridisierungssignal zu ergeben. Die mRNA für das Protein p35 läuft also parallel zur mRNA für das Protein p94 und beide benutzen möglicherweise dieselbe Polyadenylierungsstelle. Dies ergibt ein Transkriptionsschema, das typisch für Herpesviren ist und in vielen detailliert untersuchten Regionen, vor allem bei Herpes Simplex Virus, beobachtet wurde (Weigel und Miller 1985, Wagner 1984, Holland et al 1984, Jenkins et al 1984). Eine 1,3kbp mRNA wurde durch Northern Blots im BamHI Z Fragment kartiert. Diese RNA hybridisiert jedoch nicht mit dem Plasmid pCZR1495, das in der hybrid selected Translation für das 35/38kd-Protein positiv ist. Entweder ist die 1,3kbp mRNA daher nicht die mRNA für dieses Protein, oder durch die Denaturierung der RNA beim Northern Blot wird eine mRNA-Vorstufe, die sich noch in das Plasmid pCZR1495 erstreckt, vollständig prozessiert in die 1,3kbp mRNA. Durch die Denaturierung erhielte man dann im Northern Blot nur die prozessierte Form, die nicht mit dem pCZR1495 hybridisiert, während in der hybrid selected Translation noch mRNA-Vorstufen mit dem pCZR1495 hybridisieren können, die (eventuell nach später erfolgter Prozessierung) dann auch mit dem pCZR1495 positiv für das 35/38kd-Protein sind.

Der dritte offene Leserahmen BZLF2 wird in ein 140kd-Protein exprimiert. Da er nur 650 Nukleotide umfaßt, ist der BZLF2 Leserahmen wahrscheinlich nur ein Exon, und die mRNA gesplacet. Eine 3,7kbp mRNA hybridisiert mit dem BamHI e3 Fragment, diese kann jedoch auch vom gegenüberliegenden Strang bis zu einer Polyadenylierungsstelle bei 102kbp transkribiert werden. Das Protein konnte in der in vitro Translation nicht identifiziert werden. Eine mögliche Ursache hierfür

ist die Existenz eines potentiellen Signalpeptids am 5'-Ende des Leserahmens. Diese Aminosäuresequenz erfüllt alle Bedingungen der Signalpeptid-Konsensus-Sequenz (Perlman und Halvorson 1983). Der Signalpeptidhypothese entsprechend werden die ersten Aminosäuren an freien Ribosomen translatiert und treten mit Membranen des endoplasmatischen Retikulums in Verbindung. Danach kann das Protein vollständig translatiert werden. Die Aminosäurekette wird dabei durch die Membran ins Innere des endoplasmatischen Retikulums transportiert und das Signalpeptid abgespalten (Blobel und Dobberstein 1975). Im in vitro Translationssystem, das keine Membranen enthält, wird in Gegenwart der Signalerkennungspartikel die Translation über das Signalpeptid hinaus verhindert (Walter und Blobel 1982). Signalpeptide wurden bisher bei Proteinen, die aus der Zelle ausgeschleust werden, sowie bei einigen Membranproteinen gefunden. Mit dem Antiserum gegen das p140 erhält man eine Membranfluoreszenz bei induzierten P3HR1-Zellen. Es handelt sich hier also wahrscheinlich um ein Membranprotein. Von mehreren Autoren wurde bisher ein spätes, unglycosiliertes, EBV-spezifisches Membranprotein aus dem Virus-Envelope und aus zellulären Membranen produzierender Zellen beschrieben, das ein Molekulargewicht von 140kd aufweist und nur in geringer Kopienzahl vorkommt (Müller-Lantzsch et al 1980, Edson und Thorley-Lawson 1981, Wells et al 1982).

Die Proteine p140 und p35 werden in superinfizierten Raji-Zellen vom P3HR1-Genom exprimiert, da der Leserahmen BZLF2 in Raji-DNA deletiert ist, und das Molekulargewicht des primären Translationsproduktes des p35 dem von P3HR1-Zellen entspricht. Dabei ist nicht geklärt, ob die Expression von genomischer P3HR1-DNA erfolgt, von P3HR1-het-DNA-Molekülen (im Falle des p35) oder von Rekombinanten zwischen endogener Raji-DNA und genomischer oder defekter P3HR1-DNA.

Zusätzlich zu den beschriebenen RNAs hybridisiert eine 5,4kbp große RNA, die in induzierten Raji-Zellen etwas kleiner ist, in Northern Blots mit allen drei getesteten Fragmenten (BamH1 e3, BamH1 Z, pCZR1495). Daher können Start und Stop der Transkription nicht näher bestimmt werden und der mRNA kein Protein zugeordnet werden. Das BamH1 e3 Fragment hybridisiert natürlich nicht mit RNA aus induzierten

Raji-Zellen, da diese eine Deletion von 3,15kbp, die die drei BamHI e Fragmente beinhaltet, aufweisen (Polack et al 1984a). Da trotzdem mit den beiden anderen Fragmenten eine RNA von annähernd gleicher Größe wie aus den anderen Zelllinien hybridisiert, erfolgt die Transkription dieser induzierten Raji-RNA vermutlich über die Deletion hinweg.

Außerdem hybridisierte das BamHI Z Fragment und das Plasmid pCZR1495 mit einer RNA von 1,1kbp, jedoch nur mit B95-8-RNA. Ein 33kd-Protein, das durch hybrid selected Translation ebenfalls nur mit B95-8-RNA in dieser Region kartiert wurde, wird möglicherweise von dieser RNA translatiert.

Während zwischen induzierten P3HR1-, B95-8- und Raji-Zellen die Expression der in dieser Region kodierenden Proteine variiert, ist zwischen B95-8- und 833L-Zellen kein Unterschied feststellbar, obwohl seit der Etablierung der B95-8-Zellen mit 833L-Virus (Miller et al 1972) beide Zelllinien jahrelang unabhängig voneinander in Kultur propagiert wurden. Die Variationen beruhen also wahrscheinlich nicht auf Mutationen während der Phase der in vitro Kultivierung der Zellen, die toleriert werden, da die Funktion der Proteine erhalten blieb oder die Gene für das Wachstum in Zellkultur nicht notwendig sind, sondern charakterisieren die in langer Evolution entstandenen Stammvarianten. Die Patienten, aus denen die Zellen etabliert wurden, waren wahrscheinlich bereits mit diesen unterschiedlichen Stämmen infiziert, ähnlich wie es bei Herpes Simplex Virus oder Cytomegalievirus beobachtet wurde (Spear und Roizman 1980, Hayward et al 1984).

Da die BamHI Z Region in der het-DNA enthalten ist, steht ein davon exprimiertes Produkt möglicherweise in Zusammenhang mit der Induktion des lytischen Zyklus. In P3HR1-Zellen konnten dieser Region keine zusätzlichen Proteine oder mRNAs gegenüber den anderen drei Zelllinien zugeordnet werden. Die von der het-DNA exprimierten Produkte sind also möglicherweise identisch mit entsprechenden Produkten des Standardgenoms. Der rein quantitative Effekt der vermehrten Expression - beispielsweise des vermuteten immediate early Proteins - durch die vergrößerte Kopienzahl könnte für eine verstärkte Induktion des lytischen Zyklus verantwortlich sein. Auch die etwas veränderte Größe der Proteine in P3HR1-Zellen kann eine Rolle spielen, indem dadurch die

Funktion der Proteine modifiziert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre schließlich, daß in den het-DNA-Molekülen oder in den nach Superinfektion entstandenen Rekombinanten aus infizierenden und schon vorhandenen DNA-Molekülen die Expression eines Gens durch einen an eine andere Stelle als im Standardgenom translozierten Enhancer oder Promotor beeinflusst wird. Beispielsweise könnte durch Promotoren im BamH1 W Fragment (die im latenten Stadium aktiv sind) die Transkription der p94-mRNA in Zellen, die sich im latenten Stadium befinden, erfolgen, da in den het-DNA-Molekülen diese beiden Regionen invers und somit in der richtigen Orientierung fusioniert sind (Cho et al 1984a, 1984b). Eine negative Regulation beispielsweise durch ein Repressor-Protein, das auf Promotoren des lytischen Zyklus wirkt, würde so umgangen werden. Dieses nun in latenten Zellen vorhandene (immediate early) Protein könnte nun die weitere kaskadenförmige Produktion der Virusproteine initiieren und dadurch den lytischen Zyklus in Zellen anschalten, in denen normalerweise die Expression des Virus bis auf die latenten Genprodukte reprimiert ist. Wie erwähnt, ist nur Virus aus P3HR1-Zellen, das diese defekten Partikel enthält, in der Lage, nach Superinfektion den lytischen Zyklus anzuschalten, also die negative Regulation aufzuheben.

6. Übersicht der Expression des Epstein-Barr Virus

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kartierung anhand der publizierten Sequenzdaten (Baer et al 1984) zusammengefaßt. Die von anderen Gruppen kartierten mRNAs und Proteine werden soweit möglich in die Diskussion mit einbezogen. Wie erwähnt, ist deren Kartierung jedoch meist ziemlich grob, und die Zuordnung zu einzelnen Leserahmen nur vereinzelt möglich (mit Ausnahme der Daten aus den Labors von P.Farrell und B.Barrell und der kartierten Transkripte von Manet et al). Die Heterogenität der kartierten Transkripte ist am Beispiel der BamH1 Fragmente K und A demonstriert, in denen die mRNAs relativ eingegrenzt werden können.

Einer Reihe von offenen Leserahmen konnte durch hybrid selected Translation kein Protein zugeordnet werden. Dafür können

unterschiedliche Gründe verantwortlich sein:

- Der Leserahmen wird in den kultivierten lymphoblastoiden Zelllinien nicht exprimiert.
 - Die Transkription erfolgt in so geringem Ausmaß, daß das in vitro translatierte Protein nicht identifizierbar ist. Vor allem Proteine, gegen die in den zur Immunpräzipitation verwendeten Patientenseren keine Antikörper vorhanden sind, müssen durch den erhöhten Background ohne Immunpräzipitation vergleichsweise stark exprimiert werden.
 - Die mRNAs können mit dem in vitro System nicht translatiert werden.
- Die einzelnen Punkte wurden in vorhergehenden Kapiteln bereits angesprochen und werden bei der Besprechung der einzelnen Proteine an konkreten Beispielen nochmals näher erläutert.

Die Daten sind nach der Reihenfolge der Leserahmen auf dem Genom geordnet (siehe Abb.35).

Der Leserahmen BNRF1 ist der einzige im BamHI C Fragment, der die nötige Kodierungskapazität für das 143kd-Protein besitzt. Das in vitro translatierte 143kd-Protein entspricht dem späten 143kd-Protein nach in vivo Markierung (Bayliss und Wolf 1981b), da beide von allen Seren in der vergleichenden Immunpräzipitation korreliert erkannt oder nicht erkannt werden. Eine späte mRNA von 4,75kbp (Hummel und Kieff 1982a), die dem BamHI C Fragment zugeordnet wurde, ist wahrscheinlich das entsprechende Transkript.

Im BamHI C Fragment befinden sich weiterhin noch der Origin (Anfangspunkt) der Replikation der EB1-DNA während des latenten Stadiums (Yates et al 1984) sowie Sequenzen für zwei kleine, nicht translatierte DNA-PolymeraseIII-Transkripte - die EBER-RNAs (Rosa et al 1981, Lerner et al 1981, Arrand und Rymo 1982). Außerdem liegt darin noch der BCRF1 Leserahmen, dem kein Protein zugeordnet werden konnte, der jedoch früh exprimiert wird, da frühe mRNA aus diesem Bereich als cDNA kloniert werden konnte (Manet et al 1985). Für diese Klonierungen wurde ein Subklon der P3HR1-Zelllinie gewählt, bei dem alle Zellen im latenten Stadium verbleiben, und keine spontane Synthese von EA- oder VCA-Proteinen stattfindet. Nach Induktion durch Phorbol ester und Buttersäure werden jedoch alle viralen Proteine gemacht. Die Synthese der späten Proteine kann durch Hemmung der DNA-Replikation blockiert

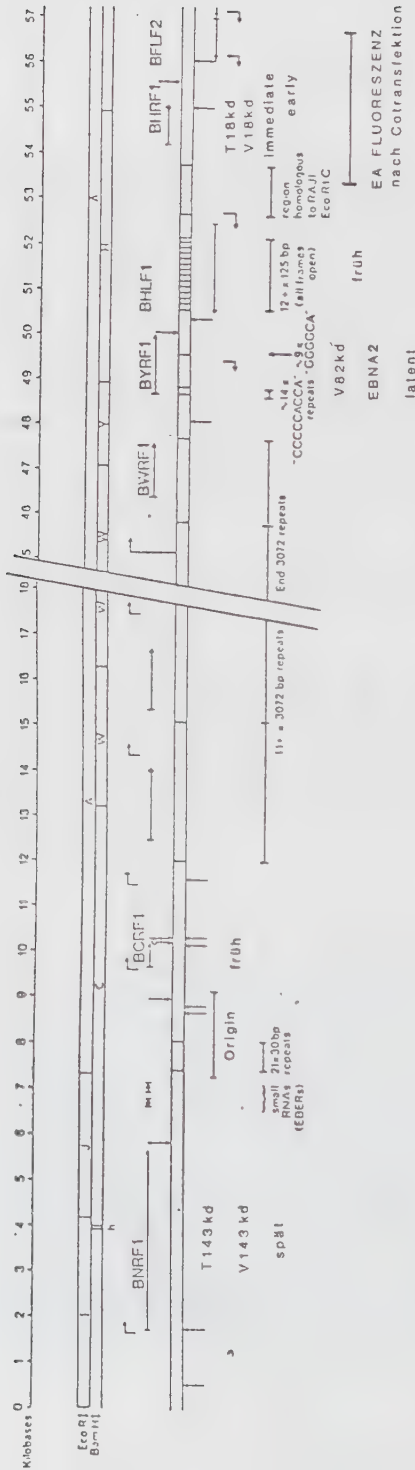


Abb. 35a

Abb. 35

Zuordnung der kartierten EBV-Proteine zu den offenen Leseramen

Unter Verwendung einer Abbildung aus Baer et al (1984) wurden kartierte Proteine aus In vitro Translationen (I) und in vivo Markierungen (V), Ergebnisse zur Transkription sowie Befunde über den Zeitpunkt der Expression einzelnen Leseramen zugeordnet.

Potenitielle Promotoren entsprechend den Sequenzdaten (→), aktive Promotoren (→), offene Leseramen (→), Polyadenylierungsstellen (↓), mRNAs mit translatierten Bereichen (→).

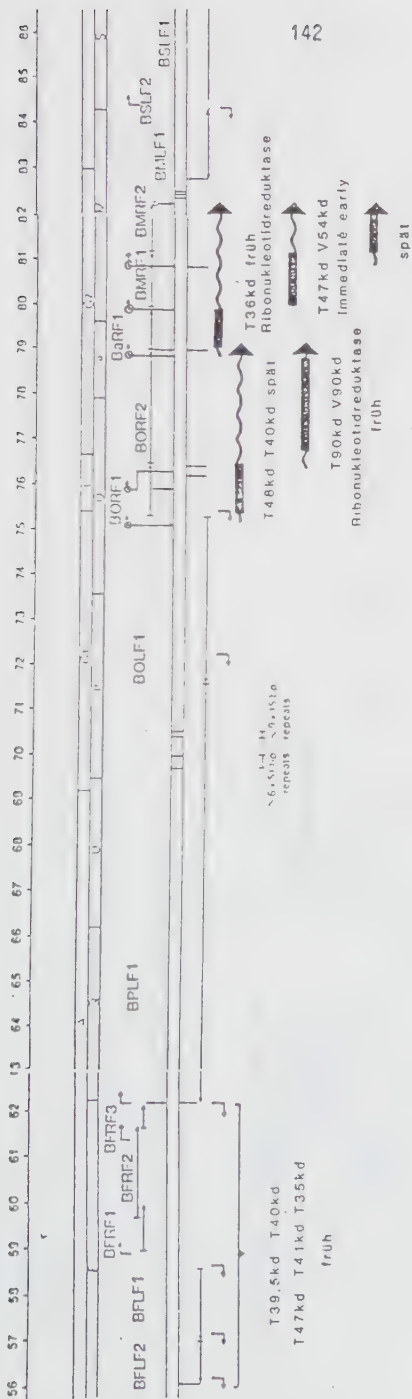


Abb. 35b

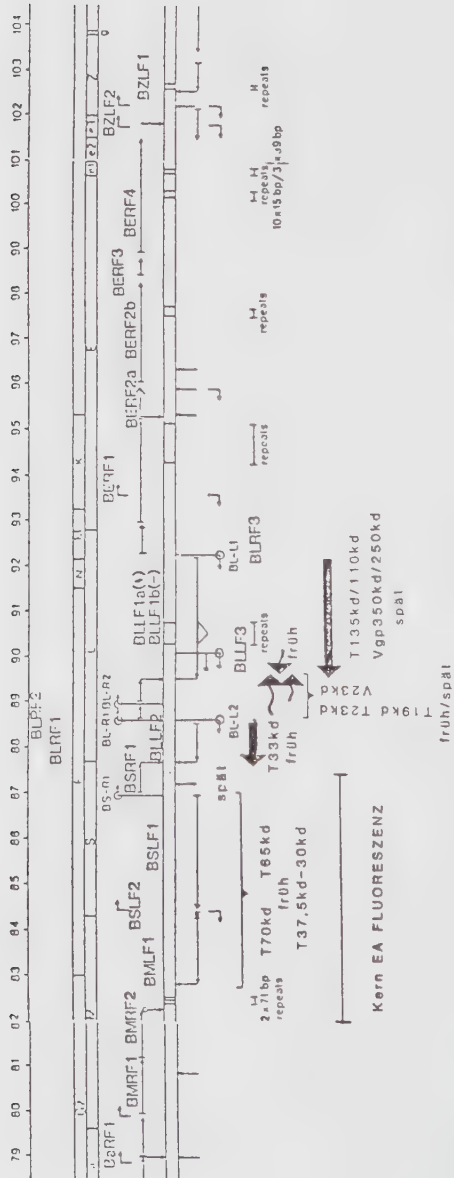


Abb. 35c

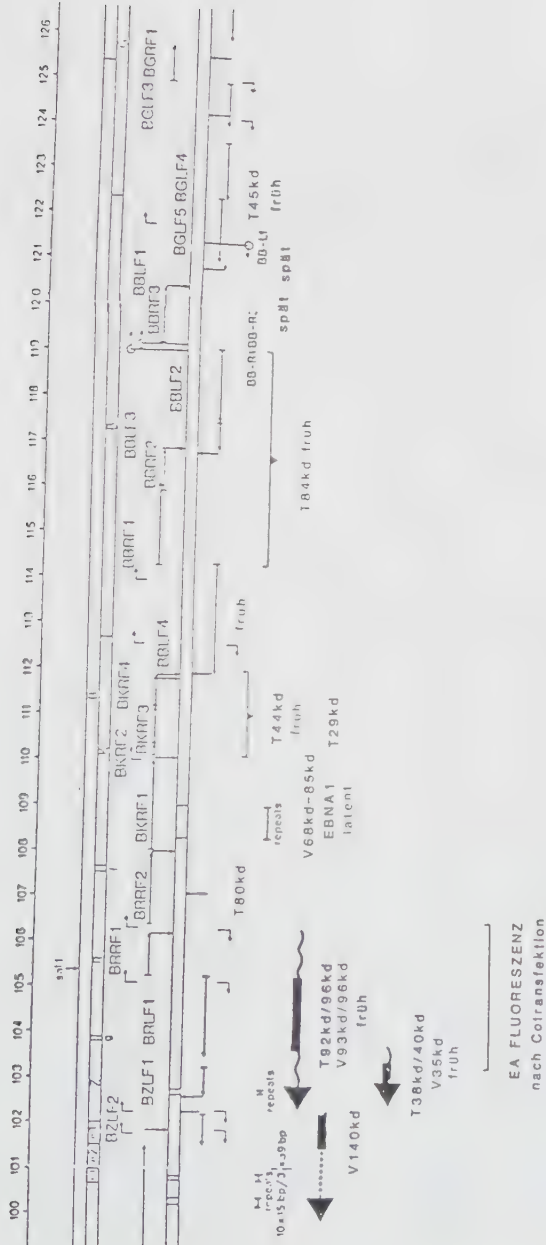


Abb. 35d

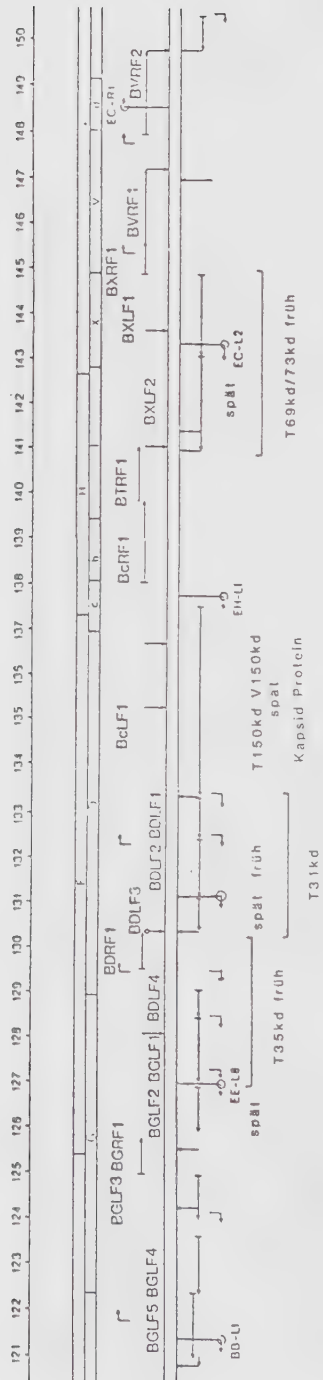


Abb. 35e

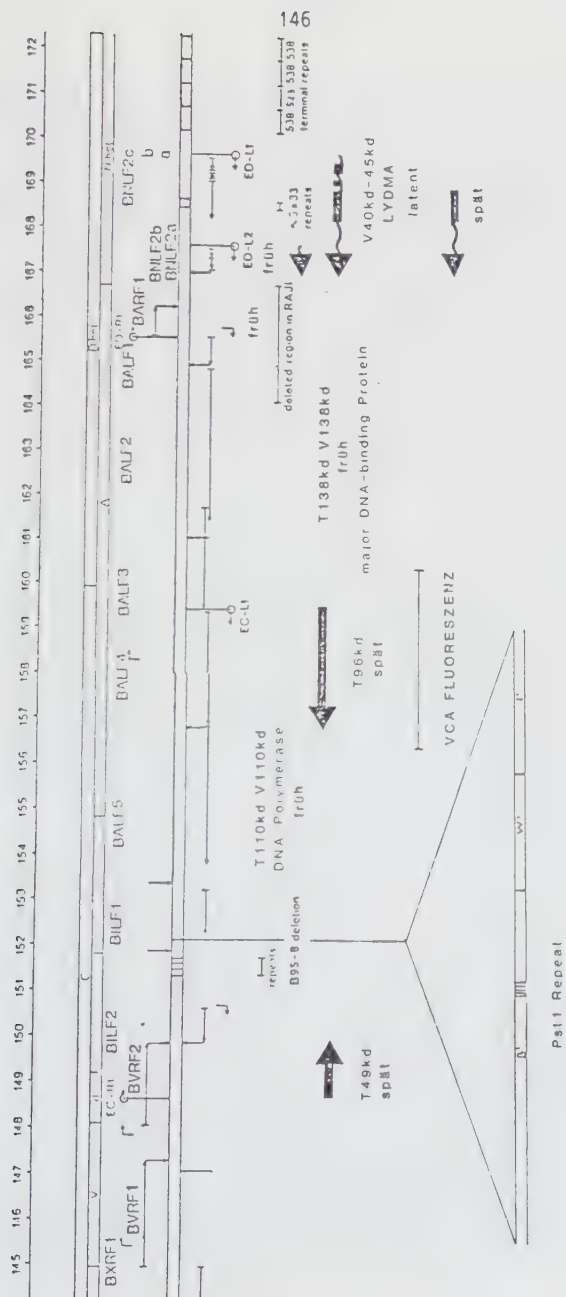


Abb. 35f

werden, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit nur frühe mRNAs als cDNA kloniert werden.

Die BamHI Fragmente W und Y werden in der latenten Phase transkribiert. Es konnten jedoch bisher durch in vitro Translationen keine Proteine identifiziert werden, und auch die genaue Transkription ist noch unklar. Mehrfach gesplicete mRNAs wurden in dieser Region kartiert (van Santen et al 1983, Bodescot et al 1984). Durch die Korrelation von DNA-Variationen mit Variationen des EBNA 2-Proteins konnte EBNA 2 dem BYRF1 Leserahmen zugeordnet werden (Dambaugh et al 1984). Dies wurde durch serologische Methoden bestätigt (Dillner et al 1985), indem mit Extrakten aus Zellen, in denen dieser Leserahmen deletiert ist (P3HR1, Daudi, Jijoye), EBNA-Fluoreszenz untereinander vollständig kompetitiv blockiert werden kann, nicht jedoch in Zellen ohne derartige Deletionen.

Der Leserahmen BHLF1, der den Not1-Repeat beinhaltet, wird nach Induktion, beispielsweise von Raji-Zellen, massiv transkribiert (Freese et al 1983, Jeang und Hayward 1983). Auch der Pst1-Repeat im BamHI B' Fragment, der Sequenzhomologien zu diesem aufweist, wird früh massiv transkribiert (Freese et al 1983) - auch in den P3HR1-Zellen (Manet et al 1985), in denen der Not1-Repeat deletiert ist. Dennoch konnte beiden Transkripten, obwohl sie polyadenyliert sind, bisher kein Protein zugeordnet werden.

Nach Transfer der BamHI Fragmente Y und H in menschliche Lymphozyten durch Fusion von Sendai Virus Membran-Vesikeln, die diese Fragmente enthielten (Volsky et al 1984), wurde die zelluläre DNA-Synthese stimuliert, eine Expression von EBNA konnte jedoch nicht festgestellt werden. Der Leserahmen BHLF1 ist möglicherweise verantwortlich für die Stimulierung der DNA-Synthese. Für die Expression des EBNA 2 ist entweder zusätzlich das BamHI W Fragment notwendig, oder/und sie erfordert zusätzliche regulatorische Signale.

Dem Leserahmen BHRF1 konnte das immediate early 18kd-Protein zugeordnet werden, das nach in vivo Markierung und in vitro Translation dieselbe Größe aufweist. Nach Kotransfektion der für dieses Protein kodierenden Region mit einem DNA-Fragment, das die Leserahmen BRLF2 und BRRF1 beinhaltet (103kbp - 106,5kbp), jedoch nicht nach Transfektion eines

der beiden DNA-Fragmente allein, wurde in Hamster-Nieren-Zellen (BHK-Zellen) eine zytoplasmatische EA-Fluoreszenz beobachtet (Takaki et al 1984). Es ist nicht geklärt, ob beide Regionen ein Produkt exprimieren, das von den Antikörpern aus dem verwendeten Serum in den fixierten Zellen als Antigen erkannt wird, oder ob nur eine (und welche) Region ein derartiges Antigen exprimiert und die zweite lediglich dazu erforderlich ist. Die Induktion der Fluoreszenz konnte auf ein knapp 3kbp großes DNA-Fragment um die BamH1 H/F Schnittstelle begrenzt werden. Wahrscheinlich ist das 18kd-Protein für die Fluoreszenz mitverantwortlich, da kein weiterer Leserahmen in dem Bereich existiert, und die Fähigkeit dazu nach BamH1 Spaltung nur reduziert, jedoch nicht völlig aufgehoben ist. Der 191 Aminosäuren umfassende Leserahmen BHRF1, der sich knapp über die BamH1-Schnittstelle hinaus erstreckt, kann nach BamH1 Spaltung nur um 31 Aminosäuren verkürzt exprimiert werden. Die schwächere Fluoreszenz nach Kotransfektion mit dem BamH1-verdaulichem Fragment kann entweder durch die verminderte Antigenität des verkürzten 18kd-Proteins erklärt werden, oder durch dessen verminderte Fähigkeit, die Synthese anderer Proteine anzuschalten. Als immediate early Protein hat das 18kd-Protein eventuell die Fähigkeit, die Synthese anderer Proteine anzuschalten. Es ist jedoch nur nach Kotransfektion mit der 103kbp - 106,5kbp Region zur Induktion einer Fluoreszenz in der Lage und könnte somit nicht generell die Synthese von frühen Proteinen anschalten. In dem Zusammenhang ist eventuell von Bedeutung, daß ein Protein aus der kotransfizierten Region, das vom BRLF2 Leserahmen, möglicherweise ebenfalls ein immediate early Protein ist.

Den Leserahmen im BamH1 F Fragment konnten eine Reihe von frühen Proteinen zugeordnet werden. Mit RNA aus induzierten Raji-Zellen konnten zusätzliche Proteine im Vergleich zur RNA aus P3HR1-Zellen identifiziert werden. Shin et al (1983b) konnten nach PAA-Hemmung von B95-8-Zellen ebenfalls zusätzliche RNAs im Vergleich zu ungehemmten B95-8-Zellen im BamH1 F Fragment kartieren. Die frühen mRNAs werden durch die Hemmung der Expression der späten Gene also wahrscheinlich angereichert. Zahl und Größe der translatierten Proteine lassen sich durchaus mit den Sequenzdaten in Einklang bringen, dennoch

repräsentieren eventuell einige der Proteine keinen eigenständigen Leserahmen. Eine genaue Zuordnung muß durch Subklonierung des BamH1 F Fragmentes erfolgen.

Die BamH1 Fragmente Q, U und P werden vollständig durch zwei große Leserahmen ausgefüllt, deren Kapazität für Proteine von 338kd und 133kd ausreichen würde. Bisher konnten kaum Transkripte und keine Proteine in diesen Fragmenten kartiert werden. Drei RNAs von 25kbp, 6,5kbp und 4,25kbp aus PAA-gehemmten Zellen, die mit dem BamH1 U Fragment hybridisierten (Shin et al 1983b), und der Befund, daß das BamH1 P Fragment nach Infektion von B-Lymphozyten mit B95-8-Virus transkribiert wird (Nonoyama et al 1983), sind der einzige Hinweis für eine Expression. Durch diese Infektion wird kein lytischer Zyklus wie bei P3HR1-Virus ausgelöst, sondern die Lymphozyten werden immortalisiert. Falls diese Region wirklich eine Rolle bei der Immortalisierung spielt, wäre das eine Erklärung dafür, daß bisher in den permanenten lymphoblastoiden Zelllinien meist keine Expression gefunden wurde. Diese Region wäre dann nur zur Initiation der Immortalisierung nötig, während die latenten Genprodukte zur Aufrechterhaltung der Transformation und zur Replikation der latenten EBV-DNA (EBNA 1) nötig sind.

Dem BORF2 Leserahmen konnte ein sowohl nach in vivo Markierung als auch nach in vitro Translation 90kd großes Protein zugeordnet werden. Es handelt sich um ein frühes Protein, da es auch in induzierten Raji-Zellen vorhanden ist. Durch einen Monoklonalen Antikörper gegen das 90kd-Protein wurde dieses als EA-R Antigen identifiziert (Pearson et al 1983). Unmittelbar vor dem Leserahmen wurde ein früher aktiver Promotor kartiert (Gibson et al 1984, Baer et al 1984). Die Transkription endet innerhalb des BamH1 a Fragments, wo sich auch eine Polyadenylierungsstelle befindet, da ein Charon4A-Klon, der den rechten Teil des BamH1 a Fragments enthält, und M13-Klone aus benachbarten Leserahmen nicht mehr mit der mRNA für das 90kd-Protein hybridisieren. Upstream (in Richtung des 5'-Endes) davon befindet sich im BamH1 O Fragment ein weiterer Leserahmen (BORF1), der rechnerisch für ein Protein von 39kd kodiert. Vor diesem wurde ein aktiver später Promotor kartiert (Baer et al 1984). Das Transkript aus dem BORF1 Leserahmen benutzt wahrscheinlich ebenfalls die Polyadenylierungsstelle nach dem

BORF2 Leserahmen, da dies die nächstgelegene - außer einer inmitten des BORF1 Leserahmens - ist. Das Protein aus dem BORF1 Leserahmen würde dann nach hybrid selected Translation ebenso wie das 90kd-Protein mit dem BamHI 0 und dem BamHI a Fragment erhalten werden. Zwei Proteine von 48kd und 40kd, die nicht mit RNA aus induzierten Raji-Zellen erhalten wurden, also wahrscheinlich spät sind, wurden ebenfalls in diesen Fragmenten kartiert. Es handelt sich dabei also möglicherweise um das (die) Produkt(e) des BORF1 Leserahmens.

Dem Leserahmen BaRF1 konnte ein 36kd Protein zugeordnet werden. Unmittelbar davor wurde ein aktiver früher Promotor kartiert (Gibson et al 1984, Baer et al 1984). Die nächstliegende Polyadenylierungsstelle liegt nach dem BMRF2 Leserahmen. Dieses Transkript wäre den vorliegenden Daten nach das einzige, das mit den BamHI Fragmenten a und M hybridisieren kann. Die Aminosäuresequenz der Proteine 90kd und 36kd (ermittelt aus der Nukleotidsequenz der jeweiligen Leserahmen) weist Homologien mit der Aminosäuresequenz der Ribonukleotid-Reduktase von Herpes Simplex Virus Typ 1 und Typ 2 auf (Gibson et al 1984). Das HSV-Enzym ist mit zwei Proteinen von 140kd und 38kd korreliert, deren Leserahmen ebenfalls unmittelbar aufeinanderfolgen, wobei die mRNAs allerdings 3'-koterminale sind und eine gemeinsame Polyadenylierungsstelle benutzen (Gibson et al 1984).

Dem Leserahmen BMRF1, vor dem ein früher Promotor kartiert wurde (Baer et al 1984), konnte das immediate early Protein 47/54kd zugeordnet werden. Das primäre Translationsprodukt beträgt 47kd, die vollprozessierte Form 54kd, wie durch Immunpräzipitation mit einem Monoklonalen Antikörper (Pearson et al 1983) gezeigt wurde. Das Protein ist phosphoryliert und bindet an DNA (Kallin persönliche Mitteilung, Epstein 1984, Roubal et al 1981, Sugawara et al 1982). Mehrere Monoklonale Antikörper gegen dieses Protein zeigen eine Kernfluoreszenz, die EA-D-Charakteristiken aufweist (Pearson et al 1983, Epstein 1984). Das 54kd-Protein kann durch Immunfluoreszenz mit einem Monoklonalen Antikörper nach Superinfektion von Raji-Zellen erheblich früher nachgewiesen werden als das 90kd-EA-Protein (Pearson et al 1983). Das Transkript reicht bis zum Ende des BMRF2 Leserahmens, wo sich eine Polyadenylierungsstelle befindet (siehe C.3.3.). Vor dem

BMRF2 Leserahmen wurde ein aktiver später Promotor kartiert (Baer et al 1984), ein entsprechendes Translationsprodukt konnte jedoch nicht identifiziert werden. Die Ergebnisse der Kartierung von Transkripten (Hummel und Kieff 1982a, Weigel und Miller 1983, Shin et al 1983a, Manet et al 1985) bestätigen die Existenz der aufgeführten mRNAs. Die Rolle einer Reihe weiterer kartierter Transkripte in diesem Bereich ist unklar.

Den Leserahmen BMLF1, BSLF2 und BSLF1 an der Grenze der BamH1 Fragmente M und S konnten die frühen Proteine 65kd und 70kd zugeordnet werden. Außerdem konnten ihnen die Proteine 37,5kd, 34kd, 31kd und 30kd zugeordnet werden, diese jedoch nur mit RNA aus P3HR1-Zellen. Es handelt sich dabei möglicherweise um Expressionsprodukte der defekten het-DNA-Moleküle, die diese Region beinhalten (Cho et al 1984a, 1984b, Miller et al 1984). Da sowohl das BamH1 M als auch das BamH1 S Fragment für all diese Proteine positiv ist, müssen sich die Transkripte über die Schnittstelle hinweg erstrecken. Ein cDNA-Klon, der Sequenzen aus dem BMLF1 Leserahmen enthält und von früher EBV-RNA stammt, hybridisiert mit einer 1,9kbp mRNA (Manet et al 1985). Dies bestätigt die frühe Transkription dieser Region. Ansonsten wurde kein Transkript im BamH1 S Fragment kartiert. Nach Transfektion des Hind3 G Fragments, das diese drei Leserahmen enthält, in BHK-Zellen wurde eine EA-Fluoreszenz im Zellkern beobachtet (Takaki et al 1984). Nach Transfektion des BamH1 W'C' Fusionsfragments aus het-DNA, das Teile der BamH1 Fragmente e1, S, M und B' des Standardgenoms enthält, wurde ebenfalls eine EA-Kernfluoreszenz erhalten (Cho et al 1984b). Die Expression des zuletzt erwähnten Antigens konnte durch Spaltung der DNA mit EcoR1 oder BamH1 drastisch reduziert werden, was dafür spricht, daß es sich bei beiden Fluoreszenzen um dasselbe Antigen handelt, da die einzige EcoR1-Stelle des Fusionsfragmentes vor dem 3'-Ende des BMLF1 Leserahmens liegt. Es handelt sich um ein EA-D-Antigen, da nur EA-D, nicht jedoch EA-R Seren positiv reagieren. Ein Monoklonaler Antikörper, der ein 65kd-Protein im Western Blot erkennt, ergibt mit induzierten Raji-Zellen nach antikomplementärer Immunfluoreszenz eine Kernfluoreszenz, die EA-D-Charakteristiken aufweist (Epstein 1984). Die an der Verbindung der BamH1 Fragmente M und S kartierten Proteine sind

also wahrscheinlich das 65kd-EA-D-Antigen für diese Fluoreszenz, da sie in der entsprechenden Region über die BamH1-Schnittstelle hinweg als frühe Proteine kartiert wurden. Die EA-Kernfluoreszenz nach Transfektion eines Fragments aus der het-DNA beweist nicht endgültig, daß dieses Antigen in P3HR1-Zellen von der het-DNA exprimiert wird. Es beweist lediglich, daß ein entsprechendes Antigen im heterologen System exprimiert werden kann. Die nach hybrid selected Translation mit RNA spezifisch aus P3HR1-Zellen erhaltenen Proteine, die antigen sind, da sie immunpräzipitiert werden, sind ein Hinweis dafür, daß die Expression dieser het-DNA-Sequenzen stattfindet, jedoch qualitativ unterschiedlich zum Standardgenom.

Ein weiteres Kernantigen wurde nach Transfektion des BamH1 M Fragments in Maus L-Zellen durch Immunfluoreszenz nachgewiesen (Grogan et al 1983). Dabei muß es sich um ein von den bisher besprochenen unterschiedliches Antigen handeln, da die Fluoreszenz mit dem isolierten BamH1 M Fragment und nicht spezifisch mit EA-positiven Seren auftrat, sondern alle Charakteristiken einer EBNA-Fluoreszenz zeigte. Weitere Hinweise zur Lokalisation eines latenten Genproduktes im BamH1 M Fragment fehlen.

Dem Leserahmen BSRF1, vor dem ein später Promotor kartiert wurde (Baer et al 1984), konnte kein Protein zugeordnet werden.

Dem Leserahmen BLLF2 konnte ein frühes 33kd-Protein zugeordnet werden. Start und Stop der Transkription erfolgen unmittelbar vor bzw. nach dem Leserahmen, wo auch ein aktiver früher Promotor (Biggin et al 1984) sowie eine Polyadenylierungsstelle gefunden wurden, da die mRNA für das Protein nicht mit Klonen aus benachbarten Leserahmen hybridisiert.

Den Leserahmen BLRF1 und BLRF2 konnten die Proteine 19kd und 23kd zugeordnet werden. Beide Proteine werden, wie bereits erwähnt, früh (das heißt in induzierten Raji-Zellen) exprimiert, wenngleich auch die hauptsächliche Synthese spät stattfindet. Dies entspricht der zeitlichen Synthese der Beta-Gamma-Proteine bei Herpes Simplex Virus. Von den Promotoren BL-R1 und BL-R2 aus erstrecken sich die Transkripte jeweils zur Polyadenylierungsstelle nach dem BLRF2 Leserahmen (Biggin persönliche Mitteilung).

Der Leserahmen BLLF1 kodiert für die späten Glycoproteine gp350 und

gp250. Aus einem Teil der mRNA-Population werden Repeat-Elemente herausgesplittet (Biggin et al 1984, Beisel et al 1985), wodurch zwei primäre Translationsprodukte von 110kd und 135kd translatiert werden, die nach der Anfügung der Zuckergruppen (Edson und Thorley-Lawson 1983) die Glycoproteine 350kd bzw. 250kd ergeben. Die beiden Proteine sind in Membranen der lytisch infizierten Zellen und im Virus-Envelope lokalisiert und wahrscheinlich für die Bindung des Virus an die EBV-Rezeptoren auf der Zelloberfläche verantwortlich (Wells et al 1982). Antikörper gegen diese Proteine neutralisieren das Virus. Dem Leserahmen BLLF3, vor dem ein aktiver früher Promotor kartiert wurde, und der in einem anderen Leseraster parallel zum BLLF1 Leserahmen läuft (Biggin et al 1984), konnte kein Protein zugeordnet werden. Die Ergebnisse der genauen Untersuchung der Transkription des BamH1 L Fragments durch Northern Blots und NukleaseS1-Kartierung (Biggin persönliche Mitteilung) stimmen vollständig mit den aufgeführten Daten überein.

Dem BamH1 E Fragment, in dem zwei Leserahmen mit Abänderungen jeweils dreimal wiederholt werden, konnte in dieser Arbeit kein Protein zugeordnet werden. Von Cohen L.K. et al (1984) wurden diesem Fragment 12 - 15 Proteine vom Molekulargewicht 105kd - 29kd zugeordnet. Die Divergenz zu dieser Arbeit und zu Hummel und Kieff (1982b) kann nicht erklärt werden.

Die Expression der BamH1 Z Region wurde im Abschnitt D.5. ausführlich diskutiert.

Das Transkript für ein 80kd-Protein erstreckt sich über die BamH1 R/f/K Schnittstellen. Nach der Lage der Promotoren und Polyadenylierungsstellen wird das Protein von einer mRNA, die nur den BRRF2 Leserahmen beinhaltet, exprimiert. Eine mRNA von 1,5kbp, die als einzige sowohl mit dem BamH1 R als auch mit dem BamH1 K Fragment hybridisiert (Hummel und Kieff 1982a), würde damit übereinstimmen. In B95-8-Zellen ist das in vitro translatierte 80kd-Protein etwas kleiner als in P3HR1-Zellen. Es handelt sich eventuell um ein spätes Protein, da es in induzierten Raji-Zellen nicht exprimiert wird.

Der BKRF1 Leserahmen kodiert für EBNA 1. Nach Transfektion des BamH1 K Fragments (Summers et al 1982, Grogan et al 1983, Haring et al 1984,

Robert et al 1984) oder des Hind3 I1f Fragments (Fischer et al 1984), das den linken Teil des BamH1 K Fragments beinhaltet, in Mäuse- oder Affenzellen sowie nach Einbringen des BamH1 K Fragments in menschliche Lymphozyten durch Sendai Virus Membran-Vesikel (Volsky et al 1984) wurde eine EBNA Fluoreszenz identifiziert. Nach Transfektion deletierter Klone konnte die kartierende Region weiter eingeschränkt werden (Hearing et al 1984, Fischer et al 1984, Robert et al 1984). Durch den Vergleich der Größe eines identifizierten EBNA-Proteins, die von 65kd bis 73kd variiert (Strnad et al 1984), mit der Länge des DNA-Fragments, das den BamH1 K Repeat beinhaltet, in verschiedenen Zelllinien (Hennessy et al 1983a) und schließlich durch die Expression des BamH1 K Repeats in Bakterien (Hennessy et al 1983b) und durch synthetische Peptide aus dem Repeat (Dillner et al 1984) wurde das Protein genau kartiert, und die Translation des Repeats in eine Abfolge von Glycin und Alanin bewiesen. Dieses EBNA-Protein ist in allen EBV-transformierten Zellen vorhanden und wurde EBNA 1 genannt. Es ist zur Replikation der zirkulären EBV-Genome in latent infizierten Zellen nötig, die durch die zelluläre DNA-Polymerase von einem Origin der Replikation im BamH1 C Fragment aus erfolgt (Yates et al 1985). Das EBNA 1-Protein ist weder durch in vitro Translation noch durch in vivo Markierung zu erfassen. Die einzige Möglichkeit es darzustellen ist Western Blotting mit anschließendem immunologischem Nachweis. Eine mRNA von 3,7kbp aus latenten Zellen, die mit dem BamH1 K Fragment hybridisiert (van Santen et al 1981), ist das EBNA 1 Transkript. Ein 2,0kbp Exon dieser mRNA, das am 5'-Ende eine Splice-Akzeptorstelle kurz vor dem Beginn des BKRF1 Leserahmens aufweist und am 3'Ende die Polyadenylierungsstelle bei 110kbp enthält, beinhaltet den BKRF1 Leserahmen (Heller et al 1982, Weigel und Miller 1985). Dieses Exon ist wahrscheinlich das einzige translatierte Exon, da nach Transfektion diese Teils ein Protein voller Größe gebildet wird (Hearing et al 1984, Fischer et al 1984, Robert et al 1984), und der offene Leserahmen erst nach der Splice-Stelle beginnt (Weigel und Miller 1985). Die Lage des (der) weiteren Exons ist nicht bekannt.

Ein frühes 44kd-Protein und ein 29kd-Protein kartieren im restlichen Teil des BamH1 K Fragments. Außer der bereits erwähnten EBNA-mRNA

wurden von Weigel und Miller (1985) zwei ungesplicete 3'-koterminale mRNAs von 1,3kbp und 2,1kbp, von Hummel und Kieff (1982a) mRNAs von 2,2kbp und 1,9kbp sowie von Shin et al (1983a) mRNAs von 0,3kbp, 0,4kbp und 0,6kbp im BamH1 K Fragment kartiert, die alle mit keinem Nachbarfragment überlappen.

Der Leserahmen BBLF4, dem kein Protein zugeordnet werden konnte, wird früh exprimiert (Manet et al 1985).

Zwischen den Nukleotiden 114 000 und 119 000 (eingegrenzt durch Charon4A-Klone) im BamH1 B Fragment kartiert das frühe 84kd-Protein, das in B95-8-Zellen etwas größer als in P3HR1- oder Raji-Zellen ist.

Vor dem Leserahmen BBRF3 wurden mindestens zwei und vor dem Leserahmen BBLF1 ein später Promotor (BB-L1) kartiert (Seguin et al 1983). Diesen Leserahmen konnten jedoch keine Proteine zugeordnet werden.

Die mRNA für das frühe 45kd-Protein überspannt die BamH1 B/G Schnittstelle. Die Leserahmen BGLF5 und/oder BGLF4 sind wahrscheinlich für dieses Protein verantwortlich. Von Manet et al (1985) wurde ein cDNA-Klon beschrieben, der beide Leserahmen beinhaltet, von früher mRNA revers transkribiert wurde und mit mRNAs von 1,8kbp und 3,4kbp hybridisiert. Ähnliche mRNAs wurden auch von Hummel und Kieff (1982a) im BamH1 B und G Fragment kartiert, nämlich 3,3kbp und 3,4kbp beziehungsweise 1,6kbp und 1,7kbp.

Weitere Zuordnungen von Transkripten in den BamH1 Fragmenten B, G und D sind aus den erwähnten Gründen und wegen der Größe dieser Fragmente nicht möglich.

Vor den Leserahmen BGLF2 und BDLF3 wurde jeweils ein später Promotor kartiert (Baer et al 1984). Ein Leserahmen aus der Region 127kbp bis 131kbp (eingegrenzt durch Charon4A-Klone) kodiert für ein frühes 35kd-Protein - eventuell der BDLF4 Leserahmen, dessen mRNA sich dem naheliegenden Transkriptionsschema zufolge als einzige über die BamH1 G/D Schnittstelle erstrecken würde.

Ein Leserahmen aus dem Bereich 130kbp bis 133kbp kodiert für ein 31kd-Protein, das wahrscheinlich ein spätes Protein ist, da es nicht mit RNA aus induzierten Raji-Zellen translatiert werden kann. Demzufolge kodiert möglicherweise der BDLF3 Leserahmen für das 31kd-Protein, da sich ein später Promotor vor diesem befindet, und da

der Leserahmen BDLF2 früh exprimiert wird (Manet et al 1985).

Der Leserahmen BcLF1 kodiert für ein spätes, nach in vivo Markierung und in vitro Translation 150kd großes Protein - ein Strukturprotein des Kapsids (Vroman et al 1985). Unmittelbar vor dem Leserahmen wurde ein später Promotor im BamH1 c Fragment kartiert (Farrell et al 1983b, Baer et al 1984).

Die mRNA für die Proteine 69kd und 73kd erstreckt sich über die BamH1 T/X Schnittstelle hinweg, daher sind wahrscheinlich die Leserahmen BXLF2 und/oder BXLF1 für diese Proteine verantwortlich. Die Proteine werden auch in induzierten Raji-Zellen produziert, sind also früh. Von Manet et al (1985) wurde ein frühes Transkript dieser Region als cDNA kloniert. Diese hybridisiert mit einer 5,1kbp mRNA. Der EC-L2 Promotor vor dem BXLF2 Leserahmen (Farrell et al 1983a) wurde als später aktiver Promotor kartiert (Baer et al 1984). Der BXLF1 Leserahmen, dessen Transkript den Polyadenylierungsstellen entsprechend erst nach dem BXLF2 Leserahmen endet, ist darum möglicherweise allein für die frühe Expression verantwortlich. Eine frühe mRNA von 5,0kbp und eine späte von 2,7kbp (Hummel und Kieff 1982a), die beide im BamH1 T und X Fragment kartieren, bestätigen diese Vermutung. Die Aminosäuresequenz des BXLF1 Leserahmens weist eine kleine Region mit Homologien zur Thymidinkinase von Herpes Simplex Virus Typ 2 auf, die jedoch auch die konservierte Sequenz einer Nukleotidbindungsstelle darstellen kann (Baer et al 1984).

Nach Transfektion von Überlappenden EBV-DNA-Klonen, die das ganze Genom beinhalten, stellte sich heraus, daß Klone, die die BamH1 D bis T Region gemeinsam haben, Affenepithelzellen transformieren konnten, so daß sie die Kapazität zu unbegrenztem Wachstum erhielten (Griffin und Karran 1984). Weitere Hinweise zur Lokalisation eines transformierenden Gens in diesem DNA-Abschnitt fehlen.

Die Proteine 140kd, 64kd, 46kd und 35kd kartieren in den BamH1 Fragmenten V und I, nicht jedoch im BamH1 d Fragment. Dies deutet, wie bereits ausgeführt (siehe C.3.1.), auf Splicing hin. Nähere Untersuchungen dazu wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Im BVRF2 Leserahmen kartiert das 49kd-Protein, das ein spätes Protein ist, da es nicht mit RNA aus induzierten Raji-Zellen translatiert

werden kann, und ein später aktiver Promotor (EC-R1) im Leserahmen kartiert wurde (Farrell et al 1983a, Baer et al 1984). Die fehlende Hybridisierung des BamHI V Fragments mit der mRNA für dieses Protein zeigt ebenfalls, daß der interne Promotor EC-R1 im BamHI d Fragment und nicht ein von der Sequenz her möglicher Promotor vor dem Leserahmen benutzt wird. Eine späte mRNA von 1,4kbp (Hummel und Kieff 1982a), die mit den BamHI Fragmenten d und I hybridisiert, ist eine weitere Bestätigung.

Der in B95-8-Zellen deletierten Region konnte bisher kein Protein und - mit Ausnahme der erwähnten Transkripte des PstI Repeats - keine RNA zugeordnet werden. Es ist anzunehmen, daß außer diesen Transkripten die Region weitere Funktionen hat, da die EBV-DNA generell dicht bepackt mit offenen Leserahmen ist, und unsinnige DNA dieser Länge (die Deletion beträgt 13,6kbp) sicher nicht konserviert worden wäre. Möglicherweise kodieren darin Funktionen, die nicht für die Replikation in den lymphoblastoiden Zelllinien (die sowieso nur beschränkt erfolgt), sondern für die Vermehrung im natürlichen Wirt erforderlich sind. Diese Funktionen würden darum in den untersuchten Zellen nicht exprimiert werden und könnten ohne Nachteil deletiert werden.

Dem BALF4 Leserahmen wurde ein 96kd-Protein zugeordnet. Es handelt sich um ein spätes Protein, da vor dem Leserahmen ein aktiver später Promotor kartiert wurde (Farrell et al 1983a, Baer et al 1984), und das Protein nicht mit RNA aus induzierten Raji-Zellen translatiert werden kann. Die Transkription beginnt am Promotor EC-L1 und endet wahrscheinlich an der Polyadenylierungsstelle bei 156,5kbp, da mit M13-Klonen aus benachbarten DNA-Regionen das Protein nicht identifiziert werden konnte. Eine späte mRNA von 3,0kbp im linken Teil des BamHI A Fragments (Hummel und Kieff 1982a), beziehungsweise späte mRNAs von 3,0kbp, 3,5kbp und 4,5kbp im BamHI A Fragment (Shin et al 1983b), sind potentielle Transkripte für dieses Protein. Die Aminosäuresequenz enthält eine Reihe potentieller Glycosilierungsstellen (Baer et al 1984). Ein spätes, glycosiliertes Kapsidprotein von 110kd (Takada et al 1983, Bayliss persönliche Mitteilung) wird möglicherweise aus dem 96kd-Precursor (ein Protein dieser Größe kann nach in vivo Markierung nicht identifiziert werden)

gebildet. Nach Transfektion eines Fragments von 4,1kbp, das den BALF4 Leserahmen enthielt und aus klonierter het-DNA stammte, in BHK-Zellen, wurde eine Fluoreszenz beobachtet (Cho et al 1984b), die durch Monoklonale Antikörper als VCA bestimmt wurde. Dies stimmt mit der Einstufung des 96kd-Proteins als spät überein.

Die Aminosäuresequenz des Leserahmens BALF5 weist Sequenzhomologien zur DNA-Polymerase von Herpes Simplex Virus auf (Baer et al 1984). Die DNA-Polymerase von Epstein-Barr Virus kodiert darum wahrscheinlich im BALF5 Leserahmen. Das Enzym wurde gereinigt (Kallin et al 1985) und dessen Größe mit 110kd bestimmt. In der hybrid selected Translation wurde ein 110kd-Protein mit den BamH1 Fragmenten d, I und A sowie dem Klon M356, nicht jedoch mit M311 erhalten. Der Klon M311 reicht von der EcoRI-Schnittstelle bei 160kbp bis zum Ende des Charon4A EB 90-99 bei etwa 157kbp. Das kartierte 110kd-Protein ist wahrscheinlich die DNA-Polymerase. Die Transkription erfolgt nach den Kartierungsdaten folgendermaßen: Vor dem BALF5 Leserahmen findet sich kein Promotor (der Promotor EC-L1 ist spät aktiv), daher liegt der Promotor wahrscheinlich innerhalb des Klons M635, der von der EcoRI-Schnittstelle bei 160kbp bis zu den terminalen Repeats reicht. Die Region des BALF4 Leserahmens wird durch Splicing entfernt - daher hybridisiert die Polymerase-mRNA nicht mit M311. Es findet sich auch keine potentielle Polyadenylierungsstelle unmittelbar nach dem BALF5 Leserahmen, so daß es durchaus möglich ist, daß die gesplizierte mRNA noch mit dem BamH1 d Fragment hybridisiert.

Dem Leserahmen BALF2 konnte ein nach in vivo Markierung und in vitro Translation 138kd großes, frühes Protein zugeordnet werden. Die Expression von Teilen des Leserahmens in Bakterien und die Immunpräzipitation des 138kd-Proteins mit dem Serum des mit den exprimierten Proteinen immunisierten Kaninchens (Mutz persönliche Mitteilung) bestätigten die Kartierung durch hybrid selected Translation. Bei dem 138kd-Protein handelt es sich um ein frühes, DNA-bindendes Protein (Bayliss und Wolf 1981b, Roubal et al 1981, Sugawara et al 1982, Kallin persönliche Mitteilung), das in induzierten Raji-Zellen nicht gebildet wird, da der Leserahmen in Raji-DNA zum Teil deletiert ist. Nach dem Vergleich der Aminosäuresequenz aus dem

Leserahmen BALF2 mit der des Herpes Simplex Virus Typ 1 ICP8 (infected cell protein 8 - Protein aus infizierten Zellen Nr.8), das hauptsächlich DNA-bindende Protein (major DNA binding protein) des Herpes Simplex Virus (McGeoch persönliche Mitteilung), wurden Homologien festgestellt, die die Annahme, daß es sich bei dem 138kd-Protein um das hauptsächlich DNA-bindende Protein des Epstein-Barr Virus handelt (Kallin persönliche Mitteilung), bestätigten. Das Herpes Simplex Virus ICP 8 wurde bereits näher untersucht. Es bindet in regelmäßigen Abständen sequenzunspezifisch bevorzugt an einzelsträngige DNA, wodurch perlschnurartige Strukturen entstehen und stimuliert die Aktivität der viralen DNA-Polymerase (Ruyechan und Weir 1984). Die negative Regulation der Expression einiger Virus-Proteine durch ICP 8 über die Reduktion der Anzahl der viralen Transkripte wurde ebenfalls berichtet (Godowski und Knipe 1983). Eine frühe mRNA von 4,2kbp im rechten Teil des BamH' A Fragments (Hummel und Kieff 1982a), beziehungsweise eine frühe mRNA von 6,5kbp im BamH1 A Fragment (Shin et al 1983b), beziehungsweise eine mRNA von 6,8kbp im rechten Teil des BamH1 A und im Nhet Fragment (Weigel und Miller 1983) könnten das entsprechende Transkript sein.

Vor dem Leserahmen BARF1 wurde ein früher aktiver Promotor kartiert (Farrell et al 1983b, Baer et al 1984), doch konnte ihm kein Protein zugeordnet werden.

Vor den Leserahmen BNLF2a und BNLF2b wurde ein früher aktiver Promotor kartiert (Farrell et al 1983b, Baer et al 1984, Hudson et al 1985), von dem eine 0,8kbp lange mRNA bis zu zwei Polyadenylierungsstellen bei 167kbp transkribiert wird (Hudson et al 1985). Dieser Region konnten keine Proteine zugeordnet werden, da diese wahrscheinlich zu klein sind, um in dem verwendeten Gelsystem aufgelöst zu werden. Aus den Sequenzdaten wurde die Expression eines 6,5kd-Proteins vom BNLF2a Leserahmen vorgeschlagen (Hudson et al 1985).

Vom Promotor ED-L1, der in der latenten Phase aktiv ist (Farrell et al 1983a, Baer et al 1984, Hudson et al 1985), wird eine latente gesplicete mRNA bis zu den Polyadenylierungsstellen bei 167kbp transkribiert, durch die die Leserahmen BNLF2a, BNLF2b und BNLF2c verbunden werden, so daß rechnerisch ein Protein von etwa 45kd davon

translatiert werden kann (Fennewald et al 1984, Hudson et al 1985). Das Protein ist ein Membranprotein, da Antiseren gegen die in Bakterien exprimierten Leserahmen (Hennessy et al 1984) und gegen synthetische Peptide aus den Leserahmen (Modrow persönliche Mitteilung) Membranfluoreszenzen hervorrufen. Möglicherweise ist dieses Protein das lymphocyte detected membrane antigen (von Lymphozyten erkanntes Membranantigen - LYDMA). Während der späten Phase des lytischen Zyklus wird ein Promotor im zweiten Intron aktiv, durch den eine verkürzte mRNA gebildet wird, der die ersten beiden kleinen Exons fehlen (Hudson et al 1985). Das entsprechende Protein hätte dann nur noch zwei von ursprünglich sechs potentiellen Transmembranregionen. In der hybrid selected Translation wurde das Protein nicht identifiziert, da die verwendeten Patientenseren dafür nicht geeignet sind, und zur Identifizierung ohne Immunpräzipitation die Anzahl der mRNAs und der translatierten Proteine wahrscheinlich zu gering ist.

Literatur

Andersson-Anvert, M., Forsby, N., Klein, G. und Henle, W., Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination. *International Journal of Cancer*, 20, 486-494, 1977

Arrand, J.R., Rymo, L., Walsh, J.E., Björck, E., Lindahl, T. und Griffin, B.E., Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Research*, 9, 2999-3014, 1981

Arrand, J.R. und Rymo, L., Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of Virology*, 41, 376-389, 1982

Arrand, J.R., Walsh-Arrand, J.E. und Rymo, L., Cytoplasmic RNA from normal and malignant human cells shows homology to the DNAs of Epstein-Barr virus and human adenoviruses. *The EMBO Journal*, 2, 1673-1683, 1983

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tuffnell, P.S. und Barrell, B.G., DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-211, 1984

Bankier, A.T., Deininger, P.L., Farrell, P.J. und Barrell, B.G., Sequence analysis of the 17,166 base-pair EcoRI fragment C of B95-8 Epstein-Barr virus. *Molecular Biology and Medicine*, 1, 21-45, 1983a

Bankier, A.T., Deininger, P.L., Satchwell, S.C., Baer, R., Farrell, P.J. und Barrell, B.G., DNA sequence analysis of the EcoRI Dhet fragment of B95-8 Epstein-Barr virus containing the terminal repeat sequences. *Molecular Biology and Medicine*, 1, 425-445, 1983b

- Batterson, W. und Roizman, B., Characterization of the Herpes Simplex virion-associated factor responsible for the induction of α genes. *Journal of Virology*, 46, 371-377, 1983
- Bayliss, G.J. und Wolf, H., Epstein-Barr virus-induced cell fusion. *Nature*, 287, 164-165, 1980
- Bayliss, G.J. und Wolf, H., An Epstein-Barr virus early protein induces cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 78, 7162-7165, 1981a
- Bayliss, G.J. und Wolf, H., The regulated expression of Epstein-Barr virus. III. Proteins specified by EBV during the lytic cycle. *Journal of General Virology*, 56, 105-118, 1981b
- Bayliss, G.J. und Wolf, H., Effect of the arginine analog canavanine on the synthesis of Epstein-Barr virus-induced proteins in superinfected Raji cells. *Journal of Virology*, 41, 1109-1111, 1982
- Bayliss, G.J., Deby G. und Wolf, H., An immunoprecipitation blocking assay for the analysis of EBV induced antigens. *Journal of Virological Methods*, 7, 229-239, 1983
- Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F., und Kieff, E., Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *Journal of Virology*, 54, 665-674, 1985
- Biggin, M., Farrell, P.J. und Barrell, B.G., Transcription and DNA sequence of the BamHI L fragment. *The EMBO Journal*, 3, 1083-1090, 1984
- Blacklow, N.R., Watson, B.K., Miller, G. und Jacobson, B.M., Mononucleosis with heterophile antibodies and E.B. virus infection acquired by an elderly patient in hospital american. *Journal of Medicine*, 51, 549-552, 1971

- Blobel, G. und Dobberstein, B., Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *Journal of Cell Biology*, 67, 835-851, 1975
- Bodescot, M., Chambraud, B., Farrell, P. und Perricaudet, M., Spliced RNA from the IR1-U2 region of Epstein-Barr virus: presence of an open reading frame for a repetitive polypeptide. *The EMBO Journal*, 3, 1913-1917, 1984
- Bornkamm, G.W., Delius, H., Zimmer, U., Hudewentz, J. und Epstein, M.A., Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *Journal of Virology*, 35, 603-618, 1980
- Bornkamm, G.W., Hudewentz, J., Freese, U.K. und Zimmer, U., Deletion of the non-transforming Epstein-Barr virus strain P3HR1 causes fusion of the large internal repeat to the DS_L region. *Journal of Virology*, 43, 952-968, 1982
- Buell, G.N., Reisman, D., Kintner, C., Crouse, G. und Sugden, B., Cloning overlapping DNA fragments from the B95-8 strain of Epstein-Barr virus reveals a site of homology to the internal repetition. *Journal of Virology*, 40, 977-982, 1981
- Cheung, A. und Kieff, E., Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, 44, 286-294, 1982
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. und Rutter, W.J., Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5294-5299, 1979
- Cho, M.S., Bornkamm, G.W. und zur Hausen, H., Structure of defective DNA molecules in Epstein-Barr virus preparations from P3HR1 cells. *Journal of Virology*, 51, 199-207, 1984a

- Cho, M.S., Gissman, L. und Hayward, S.D., Epstein-Barr virus (P3HR1) defective DNA codes for components of both the early antigen and viral capsid antigen complexes. *Virology*, 137, 9-19, 1984b
- Chou, P.Y. und Fasman, G.D., Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions. *Biochemistry*, 13, 211-222, 1974a
- Chou, P.Y. und Fasman, G.D., Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13, 222-245, 1974b
- Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L. und Eisenberg, R.J., Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes Simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. *Journal of Virology*, 49, 102-108, 1984
- Cohen, L.K., Speck, S.H., Roberts, B.E. und Strominger, J.L., Identification and mapping of polypeptides encoded by the P3HR1 strain of Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 4183-4187, 1984
- Dambaugh, T., Nkrumah, F.K., Biggar, R.J. und Kieff, E., Epstein-Barr virus RNA in Burkitt tumor tissue. *Cell*, 16, 313-322, 1979
- Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N. und Kieff, E., Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 77, 2999-3003, 1980
- Dambaugh, T. und Kieff, E., Identification and nucleotide sequences of two similar tandem direct repeats in Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, 44, 823-833, 1982
- Dambaugh, T., Hennessy, K., Chamnankit, L. und Kieff, E., U2 region of

Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. Proceedings of the National Academy of Science USA, 81, 7632-7636, 1984

Datta, A., de Haro, C. und Ochoa, S., Translational control by hemin is due to binding to cyclic AMP-dependant protein kinase. Proceedings of the National Academy of Science USA, 75, 1148-1152, 1978

Desgranges, C., Wolf, H., De-The, G., Shanmugaratnam, K., Cammoun, N., Ellouz, R., Klein, G., Lennert, K., Munoz, N. und zur Hausen, H., Nasopharyngeal carcinoma. X. Presence of Epstein-Barr genomes in separated epithelial cells of tumors in patients from Singapore, Tunisia and Kenya. International Journal of Cancer, 16, 7-15, 1975

Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O., A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Research, 12, 387-395, 1984

Dietzschold, B., Eisenberg, R.J., Ponce de Leon, M., Golub, E., Hudecz, F., Varrichio, A. und Cohen, G.H., Fine structure analysis of type-specific and type-common antigenic sites of Herpes Simplex virus glycoprotein D. Journal of Virology, 52, 431-435, 1984

Dillner, J., Sternas, L., Kallin, B., Alexander, H., Ehlin-Henriksson, B., Jornvall, H., Klein, G. und Lerner, R., Antibodies against a synthetic peptide identify the Epstein-Barr virus determined nuclear antigen. Proceedings of the National Academy of Science USA, 81, 4652-4656, 1984

Dillner, J., Kallin, B., Ehlin-Henriksson, B., Timar, L. und Klein, G., Characterization of a second Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen associated with the BamH1 WYH region of EBV DNA. International Journal of Cancer, 35, 359-366, 1985

Edson, C.M. und Thorley-Lawson, D.A., Epstein-Barr virus membrane antigens: characterization, distribution, and strain differences.

Journal of Virology, 39, 172-184, 1981

Edson, C.M. und Thorley-Lawson, D.A., Synthesis and processing of the three major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus. Journal of Virology, 46, 547-556, 1983

Epstein, M.A. und Achong, B.G., The Epstein-Barr virus. Berlin 1979

Epstein, A.L., Immunobiochemical characterization with monoclonal antibodies of Epstein-Barr virus-associated early antigens in chemically induced cells. Journal of Virology, 50, 372-379, 1984

Farrell, P.J., Deininger, P.L., Bankier, A. und Barrell, B., Homologous upstream sequences near Epstein-Barr virus promoters. Proceedings of the National Academy of Science USA, 80, 1565-1569, 1983a

Farrell, P.J., Bankier, A., Seguin, C., Deininger, P. und Barrell, B.G., Latent and lytic cycle promoters of Epstein-Barr virus. The EMBO Journal, 2, 1331-1338, 1983b

Feighny, R.J., Farrell, M.P. und Pagano, J.S., Polypeptide synthesis and phosphorylation in Epstein-Barr virus-infected cells. Journal of Virology, 34, 455-463, 1980

Feighny, R.J., Henry, B.E. und Pagano, J.S., Epstein-Barr virus polypeptides: effect of inhibition of viral DNA replication on their synthesis. Journal of Virology, 37, 61-71, 1981

Fennewald, S., van Santen, V. und Kieff, E., Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. Journal of Virology, 51, 411-419, 1984

Fischer, D.K., Robert, M.F., Shedd, D., Summers, W.P., Robinson, J.E., Wolak, J., Stefano, J.E. und Miller, G., Identification of Epstein-Barr

nuclear antigen polypeptide in mouse and monkey cells after gene transfer with a cloned 2.9-kilobase-pair subfragment of the genome. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 43-47, 1984

Freese, U.K., Laux, G., Hudewentz, J., Schwarz, E. und Bornkamm G.W., Two distant clusters of partially homologous small repeats of Epstein-Barr virus are transcribed upon induction of an abortive or lytic cycle of the virus. *Journal of Virology*, 48, 731-743, 1983

Fresen, K.O., Cho, M.S., Gissmann, L. und zur Hausen, H., NC37-R1 EB virus: a possible recombinant between intracellular NC37 viral DNA and superinfecting P3HR1 EBV. *Intervirology*, 12, 303-310, 1979

Frink, R.J., Eisenberg, R., Cohen, G. und Wagner, E.K., Detailed analysis of the portion of the Herpes Simplex virus type 1 genome encoding glycoprotein C. *Journal of Virology*, 45, 634-647, 1983

Gibson, T., Stockwell, P., Ginsberg, M. und Barrell, B., Homology between two EBV early genes and HSV ribonucleotide reductase and 38k genes. *Nucleic Acids Research*, 12, 5087-5099, 1984

Given, D., Yee, D., Griem, K. und Kieff, E., DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, 30, 852-862, 1979

Godowski, P.J. und Knipe, D.M., Mutations in the major DNA-binding protein gene of Herpes Simplex virus type 1 result in increased levels of viral gene expression. *Journal of Virology*, 47, 478-486, 1983

Griffin, B.E. und Karran, L., immortalization of monkey epithelial cells by specific fragments of Epstein-Barr virus DNA. *Nature*, 309, 78-82, 1984

Grogan, E.A., Summers, W.P., Dowling, S., Shedd, D., Gradoville, L. und Miller, G., Two Epstein-Barr viral nuclear neoantigens distinguished by

gene transfer, serology, and chromosome binding. Proceedings of the National Academy of Science USA, 80, 7650-7653, 1983

Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology, 166, 557-580, 1983

Hayward, S.D., Lazarowitz, S.G. und Hayward, G.S., Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. II. Fine mapping of the boundaries of the internal repeat cluster of B95-8 and identification of additional small tandem repeats adjacent to the HR-1 deletion. Journal of Virology, 43, 201-212, 1982

Hayward, G.S., Ambinder, R., Ciuffo, D., Hayward, S.D. und LaFemina, R.L., Structural organization of human Herpesvirus DNA molecules. The Journal of Investigative Dermatology, 83, 29s-41s, 1984

Hearing, J.C., Nicolas, J.C. und Levine, A.J., Identification of Epstein-Barr virus sequences that encode a nuclear antigen expressed in latently infected lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Science USA, 81, 4373-4377, 1984

Heller, M., Dambaugh, T. und Kieff, E., Epstein-Barr virus DNA. IX. Variation among viral DNAs from producer and nonproducer infected cells. Journal of Virology, 38, 632-648, 1981

Heller, M., van Santen, V. und Kieff, E., Simple repeat sequence in Epstein-Barr virus DNA is transcribed in latent and productive infections. Journal of Virology, 44, 311-320, 1982a

Heller, M., Henderson, A. und Kieff, E., Repeat array in Epstein-Barr virus DNA is related to cell DNA sequences interspersed on human chromosomes. Proceedings of the National Academy of Science USA, 79, 5916-5920, 1982b

Heller, M., Flemington, E., Kieff, E. und Deininger, P., Repeat arrays

in cellular DNA related to the Epstein-Barr virus IR3 repeat. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 457-465, 1985

Henderson, A., Ripley, S., Heller, M. und Kieff, E., Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 80, 1987-1991, 1983

Henle, G., Henle, W. und Klein, G., Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. *International Journal of Cancer*, 8, 272-282, 1971

Henle, W. und Henle, G., Seroepidemiology of the virus. In: Epstein, M.A. und Achong, B.G. (eds), *The Epstein-Barr virus*. 61-78, Berlin, 1979

Hennessy, K., Heller, M., van Santen, V. und Kieff, E., Simple repeat array in Epstein-Barr virus DNA encodes part of the Epstein-Barr nuclear antigen. *Science*, 220, 1396-1398, 1983a

Hennessy, K. und Kieff, E., One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 80, 5665-5669, 1983b

Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T. und Kieff, E., A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 7207-7211, 1984

Heston, L., Rabson, M., Brown, N. und Miller, G., New Epstein-Barr virus variants from cellular subclones of P3J-HR-1 Burkitt lymphoma. *Nature*, 295, 160-163, 1982

Hirayama, T. und Ito, Y., A new view of the etiology of nasopharyngeal carcinoma. *Preventive Medicine*, 10, 614-622, 1981

- Holland, L.E., Sandri-Goldin, R.M., Goldin, A.L., Glorioso, J.C. und Levine, M., Transcriptional and genetic analyses of the Herpes Simplex virus type 1 genome: coordinates 0.29 to 0.45. *Journal of Virology*, 49, 947-959, 1984
- Honess, R.W., Herpes Simplex and "the Herpes complex": diverse observations an a unifying hypothesis. *Journal of General Virology*, 65, 2077-2107, 1984
- Honess, R.W. und Roizman, B., Regulation of Herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of Virology*, 14, 8-19, 1974
- Honess, R.W. und Watson, D.H., Unity and diversity in the Herpesviruses. *Journal of General Virology*, 37, 15-37, 1977
- Hopp, T.P. und Woods, K.R., Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 78, 3824-3828, 1981
- Hudewentz, J., Delius, H., Freese, U.K., Zimmer, U. und Bornkamm, G.W., Two distant regions of the Epstein-Barr virus genome with sequence homologies have the same orientation and involve small tandem repeats. *The EMBO Journal*, 1, 21-26, 1982
- Hudson, G.S., Farrell, P.J. und Barrell, B.G., Two related but differentially expressed potential membrane proteins encoded by the EcoRI Dhet region of Epstein-Barr virus B95-8. *Journal of Virology*, 53, 528-535, 1985
- Hummel, M. und Kieff, E., Epstein-Barr virus RNA. VIII. Viral RNA in permissively infected B95-8 cells. *Journal of Virology*, 43, 262-272, 1982a

Hummel, M. und Kieff, E., Mapping of polypeptides encoded by the Epstein-Barr virus genome in productive infection. Proceedings of the National Academy of Science USA, 79, 5698-5702, 1982b

Hummel, M., Thorley-Lawson, D. und Kieff, E., An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). Journal of Virology, 49, 413-417, 1984

Ito, Y., Kawanishi, M., Hirayama, T. und Takabayashi, S., Combined effect of the extracts from *Croton tiglium* or *Euphorbia lathyris* and n-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR1 and Raji cells. Cancer Letters, 12, 175-180, 1981

Jeang, K.T. und Hayward, S.D., Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. III. Location of the P3HR1 deletion junction and characterization of the NotI repeat units that form part of the template for an abundant 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced mRNA transcript. Journal of Virology, 48, 135-148, 1983

Jelinek, W.R., Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. Annual Review of Biochemistry, 51, 813-844, 1982

Jenkins, F.J. und Howett, M.K., Characterization of mRNAs that map in the BglII N fragment of the Herpes Simplex virus type 2 genome. Journal of Virology, 52, 99-107, 1984

Jones, M.D. und Griffin, B.E., Clustered repeat sequences in the genome of Epstein-Barr virus. Nucleic Acids Research, 11, 3919-3935, 1983

Jones, M.D., Foster, L., Sheedy, T. und Griffin, B.E., The EB virus genome in Daudi Burkitt's lymphoma cells has a deletion similar to that observed in a non-transforming strain (P3HR1) of the virus. The EMBO Journal, 3, 813-821, 1984

Kallin, B., Luka, J. und Klein, G., Immunochemical characterization of

- Epstein-Barr virus-associated early and late antigens in n-butyrate-treated P3HR1 cells. *Journal of Virology*, 32, 710-716, 1979
- Kallin, B. und Klein, G., Epstein-Barr virus carried by Raji cells: a mutant in early functions? *Intervirology*, 19, 47-51, 1983
- Kallin, B., Sternas, L., Saemundssen, A.K., Luka, J., Jörnvall, H., Eriksson, B., Tao, P.Z., Nilsson, M.T. und Klein, G., Purification of Epstein-Barr virus DNA polymerase from P3HR1 cells. *Journal of Virology*, 54, 561-568, 1985
- Kawanishi, M., Sugawara, K. und Ito, Y., Epstein-Barr virus-induced polypeptides: a comparative study with superinfected Raji, IUdR-treated, and N-butyrate-treated P3HR1 cells. *Virology*, 109, 72-81, 1981a
- Kawanishi, M., Sugawara, K. und Ito, Y., Epstein-Barr virus-induced early polypeptides in Raji and NC37 cells activated by diterpene ester TPA in combination with N-butyrate. *Virology*, 115, 406-409, 1981b
- King, W., Powell, A.L.T., Raab-Traub, N., Hawke, M. und Kieff, E., Epstein-Barr virus RNA. V. Viral RNA in a restringently infected, growth-transformed cell line. *Journal of Virology*, 36, 506-518, 1980
- King, W., van Santen, V. und Kieff, E., Epstein-Barr virus RNA. VI. Viral RNA in restringently and abortively infected Raji cells. *Journal of Virology*, 38, 649-660, 1981
- King, W., Dambaugh, T., Heller, M., Dowling, J. und Kieff, E., Epstein-Barr virus DNA. XII. A variable region of the Epstein-Barr virus genome is included in the P3HR1 deletion. *Journal of Virology*, 43, 979-986, 1982
- Kintner, C.R. und Sugden, B., The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell*, 17, 661-671, 1979

Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menezes, J., Nilsson, K. und Sundström, C., Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells (bone-marrow-derived), lacking the Epstein-Barr virus genome and derived from three human lymphomas. Proceedings of the National Academy of Science USA, 71, 3283-3286, 1974a

Klein, G., Giovanella, B.C., Lindahl, T., Fialkow, P.J., Singh, S. und Stehlin, J.S., Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. Proceedings of the National Academy of Science USA, 71, 4737-4741, 1974b

Kristie, T.M. und Roizman, B., Separation of sequences defining basal expression from those conferring gene recognition within the regulatory domains of Herpes Simplex virus 1 α genes. Proceedings of the National Academy of Science USA, 81, 4065-4069, 1984

Lämmler, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685, 1970

LaThangue, N.B., Shriver, K., Dawson, C. und Chan, W.L., Herpes Simplex virus infection causes the accumulation of a heat-shock protein. The EMBO Journal, 3, 267-277, 1984

Lerner, M.R., Andrews, N.C., Miller, G. und Steitz, J.A., Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic Lupus erythematosus. Proceedings of the National Academy of Science USA, 78, 805-809, 1981

Luka, J., Kallin, B. und Klein, G., Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by N-butyrate. Virology, 94, 228-231, 1979

Luka, J., Kreofsky, T., Pearson, G.R., Hennessy, K. und Kieff, E., Identification and characterization of a cellular protein that cross-reacts with the Epstein-Barr virus nuclear antigen. *Journal of Virology*, 52, 833-838, 1984

Maitland, N.J., Kinross, J.H., Busuttil, A., Ludgate, S.M., Smart, G.E. und Jones, K.W., The detection of DNA tumour virus-specific RNA sequences in abnormal human cervical biopsies by in situ hybridization. *Journal of General Virology*, 55, 123-137, 1981

Manet, E., Chevallier, A., Zhang, C.X., Ooka, T., Chavrier, P. und Daille, J., Construction and use of cDNA clones for the mapping and identification of Epstein-Barr virus early P3HR1 mRNAs. *Journal of Virology*, 54, 608-614, 1985

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J., *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, 1982

Masui, Y., Mizuno, T. und Inouye, M., Novel high-level expression cloning vehicles: 10^4 -fold amplification of *Escherichia coli* minor protein. *Biotechnology*, 2, 81-84, 1984

Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O'Shiro, E. und Kieff, E., Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science*, 226, 1322-1325, 1984

Messing, J. und Vieira, J., A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, 19, 269-276, 1982

Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. und Lipman, M., Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 69, 383-387, 1972

Miller, G., Rabson, M. und Heston, L., Epstein-Barr virus with heterogeneous DNA disrupts latency. *Journal of Virology*, 50, 174-182, 1984

Miller, G. und Sugden, B., An identification of a transforming region of Epstein-Barr viral DNA cannot be confirmed. *Virology*, 143, 478-484, 1985

Modrow, S., Genexpression lymphotroper Herpesviren nicht-menschlicher Primaten: Herpesvirus Saimiri und Herpesvirus Ateles. Dissertation, München, 1983

Morse, L.S., Pereira, L., Roizman, B. und Schaffer, P.A., Anatomy of Herpes Simplex virus (HSV) DNA. X. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 x HSV-2 recombinants. *Journal of Virology*, 26, 389-410, 1978

Müller-Lantzsch, N., Yamamoto, N. und zur Hausen, H., Analysis of early and late Epstein-Barr virus associated polypeptides by immunoprecipitation. *Virology*, 97, 378-387, 1979

Müller-Lantzsch, N., Georg, B., Yamamoto, N. und zur Hausen, H., Epstein-Barr virus-induced proteins. II. Analysis of surface polypeptides from EBV-producing and -superinfected cells by immunoprecipitation. *Virology*, 102, 401-411, 1980

Nonoyama, M., Shin, S. und Tanaka, A., Transcription of EBV genome in productively infected cells and during immortalization. In: Prasad et al (eds), Nasopharyngeal carcinoma: current concepts. 231-238, Kuala Lumpur, 1983

Norrande, J., Kempe, T. und Messing, J., Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, 26, 101-106, 1983

- Pagano, J.S., Raab-Traub, N., Feighny, R., Yang, C.S. und Pearson, G., EBV expression in nasopharyngeal carcinoma. In: Prasad et al (eds), Nasopharyngeal carcinoma: current concepts. 215-229, Kuala Lumpur, 1983
- Pearson, G.R., Vroman, B., Chase, B., Sculley, T., Hummel, M. und Kieff, E., Identification of polypeptide components of the Epstein-Barr virus early antigen complex with monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, 47, 193-201, 1983
- Peden, K., Mounts, P. und Hayward, G.S., Homology between mammalian cell DNA sequences and human herpesvirus genomes detected by a hybridization procedure with high-complexity probe. *Cell*, 31, 71-80, 1982
- Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J., An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *European Journal of Biochemistry*, 67, 247-256, 1976
- Pereira, L., Cassai, E., Honess, R.W., Roizman, B., Terni, M. und Nahmias, A., Variability in the structural polypeptides of Herpes Simplex virus 1 strains: potential application in molecular epidemiology. *Infection and Immunity*, 13, 211-220, 1976
- Perlman, D. und Halvorson, H.O., A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and procaryotic signal peptides. *Journal of Molecular Biology*, 167, 391-409, 1983
- Polack, A., Delius, H., Zimmer, U. und Bornkamm, G.W., Two deletions in the Epstein-Barr virus genome of the Burkitt lymphoma nonproducer line Raji. *Virology*, 133, 146-157, 1984a
- Polack, A., Hartl, G., Zimmer, U., Freese, U.K., Laux, G., Takaki, K., Hohn, B., Gissmann, L. und Bornkamm, G.W., A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal

carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene*, 27, 279-288, 1984b

Powell, A.L.T., King, W. und Kieff, E., Epstein-Barr virus-specific RNA. III. Mapping of DNA encoding viral RNA in restringent infection. *Journal of Virology*, 29, 261-274, 1979

Preston, C.M., Cordingley, M.G. und Stow, N.D., Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of a Herpes Simplex virus immediate early gene. *Journal of Virology*, 50, 708-716, 1984

Pulvertaft, R.J.V., Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet*, 1, 238-240, 1964

Pulvertaft, R.J.V., A study of malignant tumors in Nigeria in short term tissue culture. *Journal of Clinical Pathology*, 18, 261-273, 1965

Raab-Traub, N., Pritchett, R. und Kieff, E., DNA of Epstein-Barr virus. III. Identification of restriction enzyme fragments that contain DNA sequences which differ among strains of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 27, 388-398, 1978

Raab-Traub, N., Dambaugh, T. und Kieff, E., DNA of Epstein-Barr virus. VIII. B95-8, the previous prototype, is an unusual deletion derivative. *Cell*, 22, 257-267, 1980

Raab-Traub, N., Hood, R., Yang, C.S., Henry II, B. und Pagano, J.S., Epstein-Barr virus transcription in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Virology*, 48, 580-590, 1983

Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L. und Miller, G., Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *Journal of Virology*, 44, 834-844, 1982

Rabson, M., Heston, L. und Miller, G., Identification of a rare

Epstein-Barr virus variant that enhances early antigen expression in Raji cells. Proceedings of the National Academy of Science USA, 80, 2762-2766, 1983

Rickwood, D. und Hames, B.D. (eds), Gel electrophoresis of nucleic acids. Oxford 1982

Robert, M.F., Shedd, D., Weigel, R.J., Fischer, D.K. und Miller, G., Expression in COS-1 cells of Epstein-Barr virus nuclear antigen from a complete gene and a deleted gene. Journal of Virology, 50, 822-831, 1984

Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., DeThe, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. und Wolf, K., Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. Intervirology, 16, 201-217, 1981

Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R. und Steitz, J.A., Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. Molecular and Cellular Biology, 1, 785-796, 1981

Roubal, J., Kallin, B., Luka, J. und Klein, G., Early DNA-binding polypeptides of Epstein-Barr virus. Virology, 113, 285-292, 1981

Rüther, U. und Müller-Hill, B., Easy identification of cDNA clones. The EMBO Journal, 2, 1791-1794, 1983

Ruyechan, W.T. und Weir, A.C., Interaction with nucleic acids and stimulation of the viral DNA polymerase by the Herpes Simplex virus type 1 major DNA-binding protein. Journal of Virology, 52, 727-733, 1984

Rymo, L., Lindahl, T., Povey, S. und Klein, G., Analysis of restriction endonuclease fragments of intracellular Epstein-Barr virus DNA and

isoenzymes indicate a common origin of the Raji, NC-37, and F-265 human lymphoid cell lines. *Virology*, 115, 115-124, 1981

Seguin, C., Farrell, P.J. und Barrell, B.G., DNA sequence and transcription of the BamH1 fragment B region of B95-8 Epstein-Barr virus. *Molecular Biology and Medicine*, 1, 369-392, 1983

Shin, S., Tanaka, A. und Nonoyama, M., Transcription of the Epstein-Barr virus genome in productively infected cells. *Virology*, 124, 13-20, 1983a

Shin, S., Donovan, J. und Nonoyama, M., Phosphonoacetic acid-resistant RNA of Epstein-Barr virus in productively infected cells. *Virology*, 124, 196-200, 1983b

Shope, T., Dechairo, D. und Miller, G., Malignant lymphoma in Cottontop Marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 70, 2487-2491, 1973

Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. und Pagano, J.S., Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *The New England Journal of Medicine*, 310, 1225-1230, 1984

Skare, J. und Strominger, J.L., Cloning and mapping of BamH1 endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 77, 3860-3864, 1980

Skare, J., Farley, J. und Fresen, K., Composition of the transforming EBV recombinant genomes made by cells superinfected with P3HR1 virus. In: Kaplan et al (eds), *International Workshop on Herpesviruses*, 242-243, Bologna, 1981

- Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503-517, 1975
- Spear, P. und Roizman, B., Herpes Simplex viruses. In: Tooze, J. (ed), *Molecular biology of tumor viruses*, 2d edition, part 2: DNA tumor viruses. 615-746, Cold Spring Harbor, 1980
- Staden, R., Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Research*, 12, 505-519, 1984a
- Staden, R., Graphic methods to determine the function of nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Research*, 12, 521-538, 1984b
- Stoerker, J. und Glaser, R., Rescue of transforming Epstein-Barr virus (EBV) from EBV-genome-positive epithelial hybrid cells transfected with subgenomic fragments of EBV DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 80, 1726-1729, 1983a
- Stoerker, J., Holliday, J.E. und Glaser, R., Identification of a region of the Epstein-Barr virus (B95-8) genome required for transformation. *Virology*, 129, 199-206, 1983b
- Strnad, B.C., Schuster, T.C., Hopkins, R.F., Neubauer, R.H. und Rabin, H., Identification of an Epstein-Barr virus nuclear antigen by fluoroimmuno-electrophoresis and radioimmuno-electrophoresis. *Journal of Virology*, 38, 996-1004, 1981
- Sugawara, K., Kawanishi, M. und Ito, Y., Epstein-Barr virus-related DNA-binding proteins induced by n-butyrate in P3HR1 cells. *Virology*, 116, 354-358, 1982
- Summers, W.P., Grogan, E.A., Shedd, D., Robert, M., Liu, C.R. und Miller, G., Stable expression in mouse cells of nuclear neoantigen after transfer of a 3.4-megadalton cloned fragment of Epstein-Barr

virus DNA. Proceedings of the National Academy of Science USA, 79, 5688-5692, 1982

Takada, K., Fujiwara, S., Yano, S. und Osato, T., Monoclonal antibody specific for capsid antigen of Epstein-Barr virus. Medical Microbiology and Immunology, 171, 225-231, 1983

Takaki, K., Polack, A. und Bornkamm, G.W., Expression of a nuclear and a cytoplasmic Epstein-Barr virus early antigen after DNA transfer: cooperation of two distant parts of the genome for expression of the cytoplasmic antigen. Proceedings of the National Academy of Science USA, 81, 4568-4572, 1984

Thomas, C.A. und Dancis, B.M., Ring stability. Journal of Molecular Biology, 77, 43-55, 1973

Thomas, M., White, R.L. und Davis, R.W., Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. Proceedings of the National Academy of Science USA, 73, 2294-2298, 1976

Thomas, P.S., Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proceedings of the National Academy of Science USA, 77, 5201-5205, 1980

van Santen, V., Cheung, A. und Kieff, E., Epstein-Barr virus RNA. VII. Size and direction of transcription of virus-specified cytoplasmic RNAs in a transformed cell line. Proceedings of the National Academy of Science USA, 78, 1930-1934, 1981

van Santen, V., Cheung, A., Hummel, M. und Kieff, E., RNA encoded by the IR1-U2 region of Epstein-Barr virus DNA in latently infected, growth-transformed cells. Journal of Virology, 46, 424-433, 1983

Vieira, J. und Messing, J., The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal

primers. *Gene*, 19, 259-268, 1982

Vroman, B., Luka, J., Rodriguez, M. und Pearson, G.R., Characterization of a major protein with a molecular weight of 160,000 associated with the viral capsid of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 53, 107-113, 1985

Volsky, D.J., Gross, T., Sinangil, F., Kuszynski, C., Bartzatt, R., Dambaugh, T. und Kieff, E., Expression of Epstein-Barr virus (EBV) DNA and cloned DNA fragments in human lymphocytes following Sendai virus envelope-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 5926-5930, 1984

Wagner, E.K., Regulation of HSV transcription. *The Journal of Investigative Dermatology*, 83, 48s-52s, 1984

Walter, P. und Blobel, G., Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 299, 691-698, 1982

Weigel, R. und Miller, G., Major EB virus-specific cytoplasmic transcripts in a cellular clone of the HR-1 Burkitt lymphoma line during latency and after induction of viral replicative cycle by phorbol esters. *Virology*, 125, 287-298, 1983

Weigel, R. und Miller, G., Latent and viral replicative transcription in vivo from the BamH1 K fragment of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, 54, 501-508, 1985

Wells, A., Koide, N. und Klein, G., Two large virion envelope glycoproteins mediate Epstein-Barr virus binding to receptor-positive cells. *Journal of Virology*, 41, 286-297, 1982

Werner, J., Wolf, H., Apodaca, J. und zur Hausen, H., Lymphoproliferative disease in a Cotton-top Marmoset after inoculation

with infectious mononucleosis-derived Epstein-Barr virus. *International Journal of Cancer*, 15, 1000-1008, 1975

Wolf, H., zur Hausen, H. und Becker, V., EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biology*, 244, 245-247, 1973

Wolf, H., Werner, J. und zur Hausen, H., EBV DNA in nonlymphoid cells of nasopharyngeal carcinomas and in a malignant lymphoma obtained after inoculation of EBV into Cottontop Marmosets. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 39, 791-796, 1974

Wolf, H. und Roizman, B., The regulation of gamma (structural) polypeptide synthesis in Herpes Simplex virus types 1 and 2 infected cells. In: DeThe et al (eds), *Oncogenesis and Herpesviruses III*, part 1. 327-336, Lyon, 1978

Wolf, H., Haus, M. und Wilmes, E., Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *Journal of Virology*, 51, 795-798, 1984

Yajima, Y., Marczyńska, B. und Nonoyama, M., Transforming activity of Epstein-Barr virus obtained by superinfection of Raji cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 75, 2008-2010, 1978

Yao, Q.Y., Rickinson, A.B. und Epstein, M.A., A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *International Journal of Cancer*, 35, 35-42, 1985

Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., Gaston, J.S.H. und Epstein, M.A., In vitro analysis of the Epstein-Barr virus: host balance in long-term renal allograft recipients. *International Journal of Cancer*, 35, 43-49, 1985

Yates, J., Warren, N., Reisman, D. und Sugden, B., A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81, 3806-3810, 1984

Yates, J., Warren, N. und Sugden, B., Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313, 812-815, 1985

Zeng, Y., Zhong, J.M., Mo, Y.K. und Miao, X.C., Epstein-Barr virus early antigen induction in Raji cells by Chinese medicinal Herbs. *Intervirology*, 19, 201-204, 1983

zur Hausen, H., O'Neill, F.J. und Freese, U.K., Persisting oncogenic Herpesvirus induced by the tumour promoter TPA. *Nature*, 272, 373-375, 1978

zur Hausen, H. und Bauer, G., Tumor promoters and a naturally occurring serum factor in the induction of Epstein-Barr virus: a review. In: Prasad et al (eds), *Nasopharyngeal carcinoma: current concepts*. 315-320, Kuala Lumpur, 1983

Eigene Veröffentlichungen

1. Wolf, H., Seibl, R., Wilmes, E., Richter, W. und Zeng, Y.,
Diagnostic aspects of nasopharyngeal carcinoma with respect to its
relation to Epstein-Barr virus.
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 99, A93, 1981

2. Seibl, R., Richter, W., Zeng, Y., Gu, S.Y. und Wolf, H.,
Methods for the detection of EBV-genomes in tumor cells.
Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A 251, 438,
1982

3. Seibl, R. und Wolf, H.,
Mapping of EBV by hybrid-selected translation of RNA from P3HR-1 cells.
Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A 254, 179,
1983

4. Richter, W., Gu, S.Y., Seibl, R. und Wolf, H.,
A new method for cytological and virological examinations for the
diagnosis of NPC.
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 105, A47, 1983

5. Seibl, R. und Wolf, H.,
Mapping of EBV by hybrid-selected translation of RNA from P3HR-1 cells.
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 105, A48, 1983

6. Seibl, R. und Wolf, H.,
Mapping of EBV by hybrid-selected translation of RNA from P3HR-1 cells.
Abstracts of papers presented at the Eighth International Herpesvirus
Workshop, Oxford, 55, 1983

7. Richter, W., Gu, S.Y., Seibl, R. und Wolf, H.,
A new method for examination of carcinomas of the nasopharynx.
in: Prasad, U., Ablashi, D.V., Levine, P.H. und Pearson, G.R.(eds),
Nasopharyngeal Carcinoma - Current Concepts. 25-32, Kuala Lumpur, 1983
8. Wolf, H., Bayliss, G.J. und Seibl, R.,
New results on the biology of Epstein-Barr virus.
in: Wittmann, G., Gaskell, R.M. und Rziha, H.J. (eds), Latent Herpes
Virus infections in Veterinary Medicine. 75-90, Boston, 1984
9. Wolf, H. und Seibl, R.,
Benign and malignant disease caused by EBV.
The Journal of Investigative Dermatology, 83, 88s-95s, 1984
10. Seibl, R., Motz, M. und Wolf, H.,
Mapping of Epstein-Barr virus by translation of hybrid-selected RNA
from P3HR1 and chemically induced Raji cells.
Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A257, 162,
1984
11. Motz, M., Seibl, R., Golub, E., Barrell, B. und Wolf, H.,
Expression of the EBV early 138kd protein in E. coli.
Abstracts of papers presented at the Ninth International Herpesvirus
Workshop, Seattle, 286, 1984
12. Motz, M., Seibl, R., Golub, E., Barrell, B. und Wolf, H.,
Expression of the EBV early 138kd protein in E. coli.
Abstracts of papers presented at the Sixth International Congress of
Virology, Sendai, 23, P32-36, 1984

13. Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Jilg, W., Bayliss, G., Barrell, B., Golub, E., Zeng, Y. und Gu, S.Y.,

Strategies for the economic preparation of Epstein-Barr virus proteins of diagnostic and protective value by genetic engineering: A new approach based on segments of virus encoded gene products.

In: Williams, A.O., O'Connor, G.T., De-The, G.B. und Johnson, C.A. (eds), Virus-associated cancers in Africa. 525-539, London, 1984

14. Seibl, R. und Wolf, H.,

Mapping of Epstein-Barr virus proteins on the genome by translation of hybrid-selected RNA from induced P3HR-1 cells and induced Raji cells.

Virology, 141, 1-13, 1985

15. Wolf, H., Motz, M., Kühbeck, R., Seibl, R., Bayliss, G.J., Modrow, S. und Fan, J.,

Selection and production by genetchnological methods of medically relevant EBV-related antigens.

in: Levine, P.H., Ablashi, G.R., Pearson, G.R. and Kottaridis, S.D. (eds), Proceedings of the First International Symposium on Epstein Barr-Virus and Associated Malignant Diseases. Im Druck

16. Seibl, R. und Wolf, H.,

Characterization of the Bam H1 Z Region.

Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, im Druck

17. Seibl, R. und Wolf, H.,

Transcription and Translation of the EBV BamH1 Z region in different cell lines.

Abstracts of papers presented at the Tenth International Herpesvirus Workshop, im Druck

Danksagung

Herrn Prof.Dr.Hans Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, die finanzielle Unterstützung und insbesondere für die praktische und theoretische Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof.Dr.Horst Schmieger danke ich für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie und für reges Interesse.

Herrn Prof.Dr.Friedrich Deinhardt danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Frau Dr.Regine Scheid und Herrn Dr.Wolfgang Jilg danke ich für die Durchführung der Experimente an den Versuchstieren.

Frau Helga Schmidt und meiner Frau Ilse danke ich für Hilfeleistungen bei der Anfertigung des Manuskripts.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Virologie am Max von Pettenkofer-Institut danke ich für die gute Zusammenarbeit sowie für viele nützliche Gespräche und Diskussionen.

Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung des Sonderforschungsbereichs 51, Teilprojekt A21, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Wo 227/4) und des Curt-Bohnewald-Fonds der Universität München angefertigt.

Lebenslauf

Am 12. November 1954 wurde ich, Sohn des Johann Seibl und der Josefine Seibl, geb. Stölzl, in Altötting geboren. Von September 1961 bis Juli 1965 besuchte ich die Knabenvolksschule Neuötting. Im September 1965 wechselte ich auf das Ruperti-Gymnasium in Mühldorf, wo ich im Juni 1974 das Reifezeugnis des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges erhielt.

Von Juli 1974 bis Oktober 1975 leistete ich Zivildienst im Jugenddorf Piusheim in Glonn (Landkreis Ebersberg).

Mit dem Wintersemester 1975/76 begann ich das Studium der Diplombiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Herbst 1977 legte ich die Diplomvorprüfung und im Sommer 1980 die Diplomhauptprüfung in den Fächern Genetik, Mikrobiologie und Biochemie ab. Von Januar 1981 bis Januar 1982 fertigte ich am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Hans Wolf meine Diplomarbeit mit dem Thema "Untersuchungen zum Nachweis und zur Expression des Epstein-Barr Virus-Genoms" an. Das Diplom im Fach Biologie erhielt ich im März 1982. Seitdem befasse ich mich in der Arbeitsgruppe Molekulare Virologie von Prof. Dr. Hans Wolf am Max von Pettenkofer-Institut mit der Kartierung von Epstein-Barr Virus-Proteinen auf dem Genom, der Expression des Epstein-Barr Virus in unterschiedlichen Systemen sowie deren Regulation, woraus die vorliegende Arbeit hervorging.

Am 30. Januar 1981 heiratete ich die Studentin Ilse Hübner-Seibl, geb. Hübner. Unsere Kinder Marlene und Jakob Seibl wurden am 12. Februar 1983 beziehungsweise am 9. März 1985 geboren.

